

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

JOSIELE APARECIDA MAGALHÃES CONRADO

**MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA PARA DETERMINAÇÃO
DE FTALATOS EM ÁGUA DE HEMODIÁLISE POR CG/FID**

UBERLÂNDIA
2019

JOSIELE APARECIDA MAGALHÃES CONRADO

**MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA PARA DETERMINAÇÃO
DE FTALATOS EM ÁGUA DE HEMODIÁLISE POR CG/FID**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Química da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial
para obtenção do título de licenciado em
Química.

Orientador: Prof. Dr. Alex Domingues
Batista

UBERLÂNDIA
2019



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Coordenação do Curso de Graduação em Química
Av. João Naves de Ávila, 2121 – Campus Santa Mônica – Telefax: (34)3239-4178
Bloco 1A – Sala 235 – Uberlândia-MG – CEP: 38408-100
www.ufu.br – coliq@ufu.br



1 Ata de defesa do TCC – Trabalho de Conclusão de Curso da discente Josiele Aparecida
2 Magalhães Conrado, Matrícula 11511QMI219, do Curso de Graduação em Química
3 Licenciatura - Noturno, da Universidade Federal de Uberlândia. Aos vinte e três do mês de
4 Outubro de dois mil e dezenove às nove horas, na Sala 1D 102, do Campus Santa Mônica, teve início a
5 apresentação e defesa da disciplina (GQL042) TCC – Trabalho de Conclusão de Curso, intitulado:
6 “Microextração líquido líquido dispersiva para determinação de ftalatos em água de hemodiálise
7 por CG/FID”. A Banca Examinadora foi composta da seguinte forma: Prof. Dr.Alex Domingues
8 Batista (**Orientador**), Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter (**1º Titular**), Profa. Dra.Raquel Maria
9 Ferreira de Sousa (**2º Titular**). A discente fez a apresentação pública do TCC - Trabalho de Conclusão
10 de Curso e posteriormente foi arguido pelos membros da banca tendo sido considerado:

11 Aprovado (☒) Nota: 100 (0 a 100 pontos)

12 Reprovado (☐)

13 Considerações da Banca: FAZER ADEQUAÇÕES DO TEXTO SUBCRITICAS PELA
14 BANCA

15 _____
16 _____
17 _____
18 _____
19 _____
20 _____
21 _____
22 _____
23 _____
24 _____

25 _____
26 Prof. Dr.Alex Domingues Batista (Orientador) Alex Domingues Batista

27 Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter (1º Titular) Eduardo Mathias Richter

28 Profa. Dra.Raquel Maria Ferreira de Sousa (2ª Titular) Raquel Sousa

JOSIELE APARECIDA MAGALHÃES CONRADO

**MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO LÍQUIDO DISPERSIVA PARA
DETERMINAÇÃO DE FALATOS EM ÁGUA DE HEMODIÁLISE POR
CG/FID**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Química da
Universidade Federal de Uberlândia
como requisito parcial para obtenção do
título de licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Alex Domingues
Batista

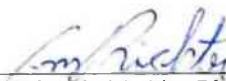
Banca Examinadora



Prof. Dr. Alex Domingues Batista
(Orientador)



Prof. Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa
(Examinadora)



Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter
(Examinador)

Uberlândia, 23 de outubro de 2019

AGRADECIMENTOS

Ao espírito santo de DEUS e a Nossa Senhora, que esteve ao meu lado e me deu força, ânimo e crença para não desistir e continuar lutando por este meu sonho e objetivo de vida. *“Quando eu senti medo de seguir, DEUS me disse: Prossiga, eu te fiz pra ser uma vencedora, desde então eu nunca mais me limitei eu guardei no coração as palavras de Deus, descobri que os planos dele para mim, são muito maiores que os meus”*.

Agradeço, em especial, ao meu Orientador Professor Dr. Alex, por me aceitar como sua aluna de Iniciação Científica, por acreditar no meu potencial, por ser esse ser humano incrível e afetuoso com seus alunos. Gratidão!

Aos membros da banca, Prof. Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa e Prof. Eduardo Mathias Richter, por aceitarem o convite em participar e por todas as contribuições para este trabalho. Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, pelo espaço físico concedido. Ao Hospital de Clínicas da UFU pelas amostras de água de hemodiálise concedida. À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao meu pai José Heitor por nunca ter desistido do meu sonho, por me apoiar e acreditar na minha capacidade, a minha Mãe Beatriz, por todas as orações, zelo, amor e fé, por me ensinar a amar todas as pessoas, à vocês dois que me deram a vida e amor, Gratidão.

A minha irmã Jaciara por ser meu escudo, pelas orações, por me incentivar e acreditar que este dia chegaria, a Maria Alice minha sobrinha, por me trazer luz e sorrisos em dias difíceis.

Aos meus avós e, em especial à vó Fiinha e ao vô Cabo, pelo amor desde antes de eu nascer, por estar presente em todas as minhas atividades escolares do ensino médio, e pelo incentivo de vencer na vida pelos estudos. Aos meus tios (as) primos(as), por serem a melhor família que existe, pela credibilidade e amor em mim depositado, em especial dedico a minha prima Ana Beatriz a quem tenho muito amor.

Agradeço ao meu companheiro e “sócio de vida”, Daniel Conrado, por estar sempre do meu lado, por todo amor que me dedica, e acima de tudo, pelo empenho em compreender o universo que envolve esta pesquisa e as minhas experiências em torno delas.

Mesmo correndo o risco de esquecer alguns nomes, gostaria de mencionar algumas pessoas em especial. Meu agradecimento aos meus amigos Weida, Aline, Giuliana, Diandra, Arlene,

Caio, Gabriel, Nathalia, Raul, Bruno, Fernando, Laís, Anátalia, aos professores Dr. Sidnei, Dr. João Flávio e a todos do nosso querido grupo de pesquisa GRISA ,vocês contribuíram com este trabalho, seja pelo companheirismo, pelas conversas na hora do café ou mesmo pelas discussões que, de uma forma ou de outra, alavancaram o aprofundamento desta pesquisa.

Grata também sou por todos os meus amigos de Capelinha, de norte a sul, e aos da graduação, Silvia, Bruna, Rafael, Aliceana, Hellen e Michele vocês tornaram a caminhada menos pesada. A todos os professores que eu tive ao longo de minha trajetória acadêmica, sem vocês nada disso seria possível.

A quem não mencionei, mas estive junto eu prometo reconhecer essa proximidade, ajuda e incentivo todos os dias da minha vida. Muitos me encorajaram durante toda a minha pesquisa, por isso meu agradecimento se estende a todos que participaram desta travessia.

“E esta é a confiança que temos nele, que se pedimos
alguma coisa, segundo a sua vontade, ele nos ouve.”

I João 5:14

RESUMO

Determinados produtos químicos têm despertado o interesse dos pesquisadores, devido ao fato de serem prejudiciais aos animais e aos humanos entre estes estão os ftalatos (ácido Ftálico). Os usos de plastificantes têm aumentado consideravelmente nas últimas décadas e com isso os efeitos que a migração de seus componentes para as bebidas, alimentos, contato com a pele, inalação, entre outros, trazem para o nosso organismo se tornam mais evidentes e preocupantes. Diante disso, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) apresenta-se como uma ótima alternativa para preparo de amostras de alimentos e ambientais, pois se baseia na partição do analito entre a fase doadora (amostra) e aceptora (solvente orgânico), onde a polaridade do analito determina sua solubilidade na fase aceptora. Um novo procedimento foi desenvolvido para extração e pré-concentração da mistura de ftalatos Bis(2-etilhexil) ftalato(DEHP), Dietil ftalato(DEP), Dimetil ftalato (DMP), Bis(1-Octyl) Ftalato(DOP) em amostras de água de hemodiálise utilizando a técnica da DLLME, a quantificação desses quatro ftalatos foi determinada por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (GC-FID). Preparou-se a mistura dos ftalatos $500\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ em solução de Acetonitrila(ACN) grau GC. Otimizou-se os tempos de análises da mistura de DMP, DEP, DEHP e DOP, totalizando 24 minutos. Identificados os tempos de cada ftalato em estudo, foram otimizados os parâmetros para as melhores condições da DLLME. Obtidas as melhores condições aplicou-se o procedimento via DLLME em uma alíquota de 0,5mL de água com uma concentração de $0,5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ dos quatro ftalatos, foi feita a injeção em triplicata no CG-FID. Os parâmetros de méritos mostraram linearidade DMP($R^2=0,99912$), DEP($R^2=0,99558$), DEHP($R^2=0,99732$) e DOP($R^2=0,99791$), limites de detecção(LD) e quantificação(LD) respectivamente, DMP($0,012 / 0,198\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), DEP ($0,046 / 0,138\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), DEHP($0,00036 / 0,0106\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), e DOP ($0,012 / 0,036\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), obteve-se coeficientes de variação menores que 1% evidenciando uma boa precisão, fatores de enriquecimento (32-161), e teste de recuperação (80-121%) e fatores de pré concentração (374 –533). Aplicando o procedimento nas amostras de águas de hemodiálise o ftalato DEHP foi encontrados em todas as amostras avaliadas em concentrações variando de 0,18 a $0,23\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, os outros três ftalatos não foram identificados nas amostras. É possível concluir que, o procedimento proposto mostrou eficiente na extração e pré-concentração dos ftalatos DMP, DEP, DEHP e DOP, pela técnica otimizada da DLMME.

Palavras-chaves: Ftalatos, água de hemodiálise, Microextração líquido líquido Dispersiva

ABSTRACT

Certain chemicals have aroused the interest of researchers, due to the fact that they are harmful to animals and humans among them are phthalates (phthalic acid). The use of plasticizers has increased considerably in recent decades and thus the effects that the migration of their components to beverages, food, skin contact, inhalation, among others, bring to our body become more evident and worrying. Therefore, the dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) is a great alternative for preparing food and environmental samples, because it is based on the partition of the analyte between the donor phase (sample) and the acceptor phase (organic solvent), A new procedure was developed for extraction and pre-concentration of the mixture of phthalates Bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), diethyl phthalate (DEP), dimethyl phthalate (DMP), Bis(1-Octil) Phthalate (DOP) in samples of hemodialysis water using the DLLME technique, the quantification of these four phthalates was determined by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID). The mixture of phthalates 500mg-L⁻¹ was prepared in Acetonitrile (ACN) grade GC solution. The times of analysis of the mixture of DMP, DEP, DEHP and DOP were optimized, totaling 24 minutes. After identifying the times of each phthalate under study, the parameters for the best conditions of the DLLME were optimized. Once the best conditions were obtained, the procedure was applied via DLLME in an aliquot of 0.5 mL of water with a concentration of 0.5 mg -L⁻¹ of the four phthalates, the injection was made in triplicate in the GC-FID. The merits parameters showed linearity DMP(R²=0.99912), DEP(R²=0.99558), DEHP(R²=0.99732) and DOP(R²=0.99791), detection limits(LD) and quantification(LD) respectively, DMP(0.012 / 0.198 mg.L⁻¹), DEP(0.046 / 0.138 mg.L⁻¹), DEHP(0.00036 / 0.0106 mg.L⁻¹), and DOP (0.012 / 0.036 mg.L⁻¹), coefficients of variation lower than 1% were obtained, showing good precision, enrichment factors (32-161), and recovery test (80-121%) and pre-concentration factors (374-533). Applying the procedure to samples of hemodialysis water, DEHP phthalate was found in all samples evaluated in concentrations ranging from 0.18 to 0.23 mg. L⁻¹, the other three phthalates were not identified in the samples. It is possible to conclude that the proposed procedure was efficient in the extraction and pre-concentration of the phthalates DMP, DEP, DEHP and DOP, by the optimized technique of DLMME.

Keywords: Phthalates, hemodialysis water, liquid dispersive liquid microextraction

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura Geral dos Ftalatos.	19
Figura 2. Fórmula estrutural dos ésteres ftálicos a serem estudados DMP, DEP, DEHP e DOP.....	20
Figura 3 Esquema representativo envolvendo as etapas da DLLME.	31
Figura 4 Principais parâmetros que afetam a eficiência da DLLME.....	32
Figura 5. Formação do sistema ternário e da fase sedimentada após injeção da mistura extrator/dispersor na amostra.	40
Figura 6. Pontos de coleta das amostras da água de hemodiálise no HCU/UF.....	45
Figura 7. Cromatograma da mistura dos quatro ftalatos DMP, DEP, DEHP e DOP(500 mg L ⁻¹ em ACN 1) em ACN	46
Figura 8. Cromatogramas dos quatro ftalatos DMP (pico lilás), DEP (pico verde), DEHP (pico azul), e DOP (pico rosa), (500 mg L ⁻¹)em ACN.....	47
Figura 9. Cromatograma de sobreposição em quatros estágios de rampa de temperaturas aplicados na metodologia de separação da mistura dos quatro ftalatos DMP, DEP, DEHP e DOP em ACN (500 mg L ⁻¹ em ACN), em A: rampa de temperatura (120 até 300 °C), com subida da rampa de aquecimento de 18°/min, totalizando 14/min, em B: rampa de temperatura (120 até 300 °C), com subida da rampa de aquecimento de 16°C/min totalizando 16min, em C: rampa de temperatura (120 até 300 °C), com subida da rampa de aquecimento de 12°C/min totalizando 19min, em D: rampa de temperatura (120 até 300 °C), com subida da rampa de aquecimento de 9°C/min totalizando 24min.	48
Figura 10. Avaliação da eficiência dos solventes extratores na extração e pré-concentração por DLLME de DMP, DEP, DEHP e DOP com concentração de 0,5 mg. L ⁻¹ em 5mL de água deionizada, (200 µL) solvente extrator e (800 µL metanol) do solvente dispersor.....	50
Figura 11. Avaliação da eficiência de diferentes solventes dispersores na extração e pré-concentração por DLLME de DMP, DEP, DEHP e DOP com concentração de 0,5 mg. L ⁻¹ em (5mL de água deionizada).	52
Figura 12. Avaliação da eficiência dos volumes do solvente extrator clorofórmio, variando de 100 a 150 µL na extração e pré-concentração por DLLME de DMP, DEP, DEHP e DOP com concentração de 0,5 mg.L ⁻¹ em 5mL de água deionizada.	53
Figura 13. Avaliação da eficiência dos tempos de extração variando de 1 min até 720 min na extração e pré-concentração por DLLME de DMP, DEP, DEHP e DOP com concentração de 0,5 mg.L ⁻¹ em 5mL de água deionizada.	55

Figura 14. Avaliação da eficiência da força Iônica com adição de NaCl, na extração e pré-concentração por DLLME de DMP, DEP, DEHP e DOP com concentração de 0,5 mg. L ⁻¹ em 5mL de água deionizada.....	56
Figura 15. Avaliação da eficiência de agitação por ultrassom com e sem adição de NaCl usando o ultrassom na extração e pré-concentração por DLLME de DMP, DEP, DEHP e DOP com concentração de 0,5 mg.L ⁻¹ em 5mL de água deionizada.	58
Figura 16. Curva analítica de calibração do DMP sem pré-concentração obtidas a partir de concentrações de 25 até 125mg.L ⁻¹ em ACN.	60
Figura 17. Curva analítica de calibração do DEP sem pré-concentração obtidas a partir de concentrações de 25 até 125mg.L ⁻¹ em ACN.	60
Figura 18. Curva analítica de calibração do DEHP sem pré-concentração obtidas a partir de concentrações de 0,5 até 125mg.L ⁻¹ em ACN.	61
Figura 19. Curva analítica de calibração do DEHP sem pré-concentração obtidas a partir de concentrações de 0,5 até 125mg.L ⁻¹ em ACN.	61
Figura 20. Curva analítica de calibração da pré-concentração do DMP, obtida por DLMME nas faixas de concentrações de 0,1 até 0, 5mg.L ⁻¹	62
Figura 21. Curva analítica de calibração da pré-concentração do DEP, obtida por DLMME nas faixas de concentrações de 0,1 até 0, 5mg.L ⁻¹	62
Figura 22. Curva analítica de calibração da pré-concentração do DEHP, obtida por DLMME nas faixas de concentrações de 0,1 até 0,5 mg L ⁻¹	63
Figura 23. Curva analítica de calibração da pré-concentração do DOP, obtida por DLMME nas faixas de concentrações de 0,1 até 0, 5mg.L ⁻¹	64
Figura 24. Cromatograma obtido por GC-FID da mistura dos ftalatos DMP, DEP, DEHP e DOP, para a amostra de água de hemodiálise, amostra IV, demonstrando presença de um dos ftalatos o DEHP contemplados no procedimento da DLLME otimizado.....	69
Figura 25. Cromatogramas da mistura do padrão dos quatro ftalatos (cor rosa) e da extração do DEHP em amostra de água de hemodiálise (cor preta), aplicado na DLMME otimizada..	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Fórmula molecular, nome IUPAC e nome comum dos ésteres ftálicos.	21
Tabela 2 Relação entre sintomas e contaminantes.....	28
Tabela 3 Métodos citados na literatura para extração e análise dos ftalatos.	35
Tabela 4 Propriedades físico-químicas dos solventes extratores via DLLME	51
Tabela 5 Parâmetros das melhores condições obtidas via DLLME	59
Tabela 6 Parâmetros de calibração das curvas obtidas sem pré-concentração.....	64
Tabela 7 Parâmetros de calibração das curvas obtidas com pré-concentração.	65
Tabela 8 Estudo da Recuperação (R) em (%) de DMP, DEP DEHP e DOP onde as amostras de água de hemodiálise fortificadas com ftalatos 0, 2mg.L-1 em ACN	66
Tabela 9 Parâmetros obtidos pelo método desenvolvido para o Fator de enriquecimento (FE) , Fator de pré concentração (FC), e coeficiente de variação (CV).	67
Tabela 10 Parâmetros obtidos pelo método desenvolvido para o Limite de Detecção (LD) e quantificação (LQ) dos ftalatos na concentração de 0,5 até 125 mg. L-1 em ACN.....	68
Tabela 11 Quantificação de DEHP em função dos pontos de coletas e dias de coleta em amostras de água de hemodiálise.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas

ACE: Acetona

ACN: Acetonitrila

ANVISA: Agência nacional de vigilância sanitária

BBzP Butilbenzil ftalato

CV Coeficiente de Variação

CONAMA Conselho Nacional do Meio Ambiente

DnBP, DBP Bis(n-butil) ftalato

DIBP Diisobutil ftalato

DIDP Diisodecil ftalato ,

DINP Di-isonil ftalato

DnHP Di-n-hexil ftalato ,

DEHP Bis(2-etilhexil) ftalato

DEP Dietil ftalato

DMP Dimetil ftalato

DOP DnOP Bis (1-Octil) Ftalato ou di-n-diocil ftalato

DOU Diário Oficial da União

DLLME *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*

EPA Agência de proteção ambiental americana

FE fator de enriquecimento

FC Fator de Pré Concentração

GC Cromatografia Gasosa

GC-FID Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização em chama

GC-MS Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

HF-LPME *Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction*

IARC *International Agency for Research on Cancer*

INCQS Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

LPME *Microextraction Liquid-Phase*

LD Limite de detecção

LQ Limite de quantificação

µL Microlitros

OSHA *Occupational Safety and Health Administration*

OMS Organização Mundial da Saúde

PVC Policloreto de vinila

R² Coeficiente de correlação linear

Rs Resolução

SDME *Microextraction Solid-Phase*

TG Temperatura de transição vítrea

UTIs Unidades de terapia intensiva

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	18
1.1- Policloreto de vinila (PVC), Ftalatos.	18
1.1.1- Migração dos Ftalatos.....	22
1.1.2- Toxicologia dos Ftalatos.....	23
1.2- A legislação brasileira para os ftalatos.....	26
1.3- Água de hemodiálise.....	27
1.4- Microextração líquido líquido Dispersiva (DLMME).....	29
1.4-1 Principais parâmetros que afetam a eficiência da DLLME.....	32
1.5- Cromatografia.....	34
2- OBJETIVO.....	36
2.1 Objetivo geral.....	36
2.1-2 Objetivo Específico.....	36
3- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	38
3.1 Limpeza e preparo de vidrarias.....	38
3.2 Instrumentação.....	38
3.3 Equipamento e Condições Cromatográficas.....	38
3.4 Otimização do procedimento de extração por DLLME.....	39
3.4.1- Solventes extrator.....	40
3.4.2- Solventes dispersor.....	40
3.4.3- Volume do Solventes extrator.....	41
3.4.4- Tempo de extração.....	41
3.4.5- Adição do Sal.....	41
3.4.6- Agitação Mecânica.....	42
3.5 Validação do método.....	42
3.6- Aplicação do Método desenvolvido na água de hemodiálise.....	44
3.6-1 Coleta das amostras.....	44
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 - Separação Cromatográfica dos Ftalatos.....	45
4.2.1- Estudo do Solvente Extrator.....	49
4.2.2 Estudo do Solvente Dispersor.....	51
4.2.3 Estudo do Volume do Solvente Extrator.....	52
4.2.4 Estudo do tempo de Extração.....	54

4.2.5	Estudo do Adição de Sal.....	55
4.2.6	Estudo da Agitação.....	57
4.3-	Característica Analíticas.....	59
4.3.1-	Linearidade	59
4.3.2-	Ensaio de Recuperação (R).....	65
4.3.3-	Fator de Enriquecimento (FE) e Fator de Pré concentração (FC), Coeficiente de Variação (CV).....	66
4.3.4-	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	68
4.4-	Aplicação em amostras de água de Hemodiálise.....	69
4.5-	Perspectivas Futuras.....	71
5-	CONCLUSÃO.....	72
	REFERÊNCIAS	73

1- INTRODUÇÃO

1.1- Policloreto de vinila (PVC), ftalatos.

Através de uma reação de polimerização do monômero cloreto de vinila, em dispersão aquosa, com presença de catalisador e de um agente dispersor, obtém-se o polímero PVC (Poli Cloreto de Vinila) final da reação por filtração (FERNANDES et. al., 1987). A produção comercial deste polímero se deu início em 1927 nos Estados Unidos e na Alemanha em 1930, mas foi durante a segunda guerra mundial que a produção do PVC cresceu significativamente, devido as necessidades da própria guerra. A partir disso, o PVC vem sendo empregado em diversas formas (FERNANDES et al., 1987). Devido a sua versatilidade e possibilidades de reagir com diferentes aditivos, o PVC apresenta possibilidades de alteração em suas características dentro de um amplo espectro de propriedades, desde alta rigidez até extrema flexibilidade, e decorrência dessas características é utilizado em amplas aplicações que vão desde tubos e perfis rígidos, para uso na construção civil, até brinquedos e filmes flexíveis utilizados no acondicionamento de alimentos, sangue, soro e plasma.(NUNES; RODOLFO JUNIOR, 2006).

Para conferir uma flexibilidade ao PVC os plastificantes são aditivos capazes de modificar propriedades tais como a viscosidade, temperatura de amolecimento, temperatura de transição vítrea (T_g) e módulos de elasticidade (MADALENO et al., 2009). Um dos mais importantes aditivos são os plastificantes, seu uso é conhecido desde os anos 50, com empregabilidade em diversos produtos tais como filmes alimentícios, mangueiras, laminados, brinquedos e calçados, material hospitalar, sendo os da família dos ftalatos de maior uso mundial. Segundo Brown et al. (1996), 88% dos plastificantes usados em PVC, são do grupo dos ftalatos.

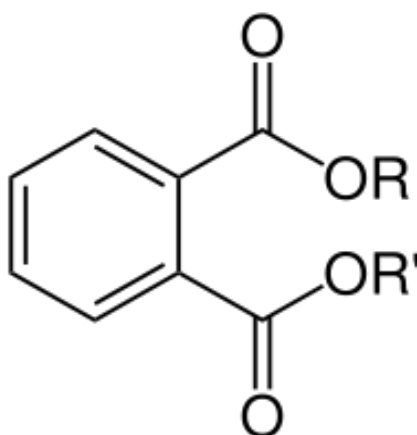
Usualmente os adipatos, ftalatos e o óleo de soja epoxidado são os mais utilizados, a faixa de concentração destes aditivos é de 20 a 40% (m/m), da massa do polímero, esta proporção é cuidadosamente escolhida para fornecer a permeabilidade adequada ao oxigênio, ao dióxido de carbono e ao vapor de água (FERNANDES et al., 1987)''.

Alguns dos ftalatos mais utilizados são o butilbenzil ftalato (BBzP), bis(n-butil) ftalato (DnBP, DBP), bis(2-etilhexil) ftalato (DEHP), dietil ftalato (DEP), diisobutil ftalato (DIBP), diisodecil ftalato (DIDP), di-isonil ftalato (DINP), dimetil ftalato (DMP), di-n-hexil ftalato (DnHP) e di-n-dioctil ftalato (DnOP, DOP). Seu uso depende em parte da sua massa

molecular, assim os ftalatos de maior massa molecular como, por exemplo, o DEHP, DIDP e DINP são utilizados em material de construção, vestuário, brinquedos e mobiliário doméstico. Os ftalatos de massa molecular relativamente baixa, tais como o DBP, DEP e DMP, são usados como solventes em adesivos, tintas, ceras, inseticidas, cosméticos e produtos farmacêuticos (BREAST CANCER & THE ENVIRONMENT RESEARCH CENTERS (BCERD), 2007).

Os ésteres ftálicos (EFs), conhecidos como ftalatos, são substâncias orgânicas derivadas do ácido 1,2-benzeno dicarboxílico. Apresentam em sua estrutura um anel benzênico ligado a dois grupos ésteres conforme mostra a Figura 1, as configurações meta e para são conhecidas como isoftalato e tereftalato respectivamente, enquanto que a orto é conhecida pelo nome genérico de ftalato (Kirk e Othmer (1967) apud Loureiro, 2002). Dos ftalatos produzidos globalmente os isômeros orto dos ácidos ftálicos e ésteres ftálicos representam a maior montante da produção destinada a plastificantes para o PVC. Já o isômero meta e seus ésteres, são utilizados principalmente como monômeros para a síntese de vários poliésteres na indústria (SCAPIN, 2009). Os ftalatos apresentam estrutura geral conforme mostra a Figura 1, o que vai diferenciar um de outro são os grupos substituintes (R,R'), neste trabalho usaremos os quatro ftalatos descritos na Figura 2.

Figura 1. Estrutura Geral dos Ftalatos.



Fonte: A autora.

Figura 2. Fórmula estrutural dos ésteres ftálicos a serem estudados DMP, DEP, DEHP e DOP.

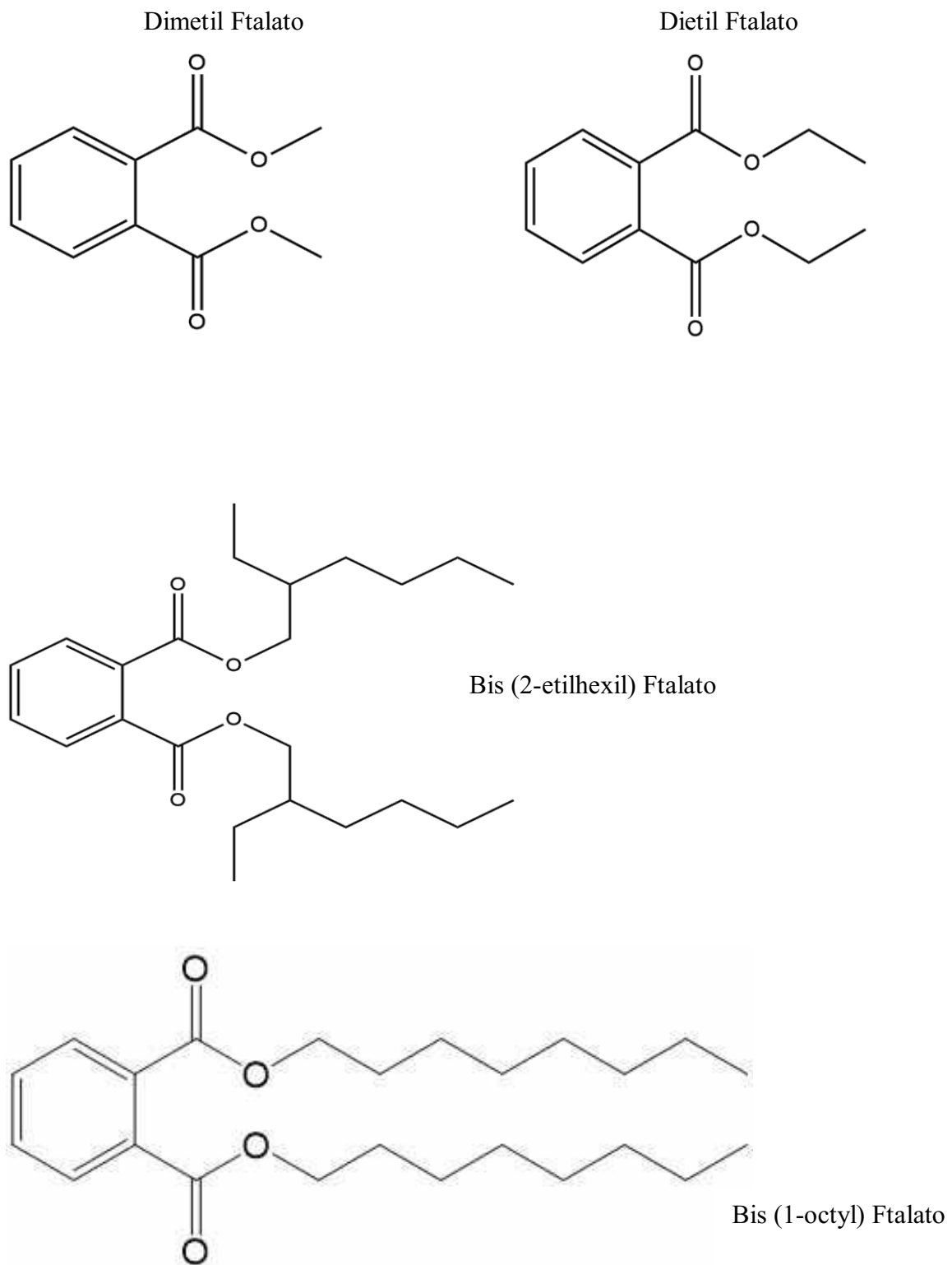


Tabela 1 Fórmula molecular, nome IUPAC e nome comum dos ésteres ftálicos.

Nome IUPAC	Nome comum	Sigla	Fórmula molecular
Dimetil 1,2-benzenodicarboxílico	Di-metil ftalato	DMP	C ₁₀ H ₁₀ O ₄
Dietil 1,2-benzenodicarboxílico	Di-etil ftalato	DEP	C ₁₂ H ₁₄ O ₄
1,2-dipropil 1,2-benzenodicarboxílico	Di-pentil ftalato	DPP	C ₁₂ H ₁₈ O ₄
Dibutil 1,2-benzenodicarboxílico	Di-butil ftalato	DBP	C ₁₆ H ₂₂ O
Bis-(2-metilpropil) 1,2-benzenodicarboxílico	Di-isobutil ftalato	DIBP	C ₁₆ H ₂₂ O ₄
Dipentil benzeno 1,2-benzenodicarboxílico	Di-exil pentil ftalato	DNPP	C ₁₈ H ₂₆ O ₄
Benzil butil 1,2-benzenodicarboxílico	Butil benzil ftalato	BBP	C ₁₉ H ₂₀ O ₄
Dihexil 1,2-benzenodicarboxílico	Di-exil ftalato	DNHP	C ₂₀ H ₃₀ O ₄
Bis-(2 etilhezil) 1,2-benzenodicarboxílico	Di-etilhexil ftalato	DEHP	C ₂₄ H ₃₈ O ₄
Diocil 1,2-benzenodicarboxílico	Octil ftalato	DOP	C ₂₄ H ₃₈ O ₄
Bis-(6-metilheptil) 1,2-benzenodicarboxílico	Di-isooctil ftalato	DIOP	C ₂₄ H ₃₈ O ₄
Bis-(7-metiloctil) 1,2-benzenodicarboxílico	Di-isononil ftalato	DINP	C ₂₆ H ₄₂ O ₄
Bis-(6-metilnonil) 1,2-benzenodicarboxílico	Di-isodecil ftalato	DIDP	C ₂₈ H ₄₆ O ₄
Dimetil 1,3-benzenodicarboxílico	Di-isometil ftalato	DMIP	C ₁₀ H ₁₀ O ₄
Dietil 1,3-benzenodicarboxílico	Di-isoetil ftalato	DEIP	C ₁₂ H ₁₄ O ₄
Dimetil 1,4-benzenodicarboxílico	Di-metiltetra ftalato	DMTP	C ₁₀ H ₁₀ O ₄
Dietil 1,4-benzenodicarboxílico	Di-etiltetra ftalato	DETP	C ₁₂ H ₁₄ O ₄

Fonte: Sarah et al.,2014, *apud* Benjamim et al.,2015, Josh et al.,2014

Segundo Reto (2007), os ftalatos fazem tanto sucesso ou seja é muito utilizado, pois eles iniciaram a utilização dos plastificantes como aditivos do PVC e permanecem a frente com o uso amplo na indústria para a fabricação de filmes de PVC. Isso porque são as substâncias que oferecem a melhor relação custo/benefício associada a uma gama de propriedades satisfatórias na área de embalagens de alimentos, principalmente na conservação e praticidade.

Mesmo diante desta realidade de intenso uso, há um lado desfavorável relacionado aos ftalatos. Estes têm sido encontrados em diversos meios devido a transferência desse plastificante para o meio ambiente durante o processo de manufatura, uso, distribuição e disposição final inadequada dos plastificantes e dos produtos que os contém (GRISA et al., 2011; MUCELIN e BELLINI, 2008). Os ésteres ftálicos tendem a se acumular no solo e nas

partículas de sedimentos, em razão do alto coeficiente de partição octanol-água, o que causa a sua permanência no meio ambiente e, conseqüentemente, a contaminação do mesmo (FERREIRA e MORITA, 2012). Devido a isso a presença de ftalatos no ambiente tem sido detectada, uma vez que estes podem migrar a partir do material inserido para o meio ambiente (FARAHAN et al., 2007; WANG et al., 2014).

O Bis (2-etilhexil) ftalato (DEHP) apresenta alto peso molecular (5 ou mais Carbonos nas cadeias laterais) que conferem maleabilidade e resistência à matriz plástica, e são os mais utilizados como plastificantes de materiais (PVC), geralmente são encontrados em revestimentos de paredes e automóveis, embalagens de alimentos, dispositivos médicos, brinquedos, materiais de construção, entre outros (ATSDR, 2002). O dibutil ftalato (DBP) apresenta menor peso molecular, é utilizado na fabricação de cosméticos e produtos de higiene pessoal, vernizes, tintas e formulações farmacêuticas, atuando como aditivos e fixadores (ATSDR, 2001).

1.1.1- Migração dos Ftalatos

A legislação brasileira descreve da seguinte forma o conceito de migração “... é a transferência de componentes do material em contato com alimentos para estes produtos, devido a fenômenos físico-químicos” (BRASIL, 2001). A definição menciona dois tipos de migração: a total ou global e a específica. A migração é do tipo global, ocorrendo a transferência de todas as substâncias para o alimento, sendo elas tóxicas ou não. Já a migração específica relaciona a transferência de uma ou mais substâncias identificáveis, reconhecidas ou consideradas como de risco para a saúde do homem, não levando em consideração a quantidade total de outros migrantes que passam para o alimento (FERNANDES *et al.* 1987).

Algumas propriedades do polímero, tais como o peso molecular, natureza e quantidade do plastificante, processo de produção, homogeneidade do composto, natureza e do tipo da área de contato com o plástico (compatibilidade com o plastificante), da temperatura e da área determinam o processo de migração (MARCILLA, GARCÍA & GARCÍA-QUESADA, 2004).

Os ftalatos devido a sua natureza fluídica, podem se difundir pelos materiais nos quais são adicionados, sendo conseqüentemente lixiviados. Esse processo leva a sua presença em diversas amostras ambientais, como no ambiente aquático pela descarga de resíduos

industriais de unidades de transformação, nos efluentes de esgotos doméstico e industrial, pela lixiviação de produtos plásticos, e no ambiente terrestre incluindo a atmosfera, lamas, solos, aterros sanitários e nas plantas (SOUZA *et all.* 2012).

Silva *et all.* (2007) relata que os processos de transporte de massa, permeação, migração e sorção pode ocorrer em todos os polímeros. As migrações de aditivos de baixo peso molecular e fragmentação de polímeros, dentre eles o monômero, são os mais evidentes tipos de interações que ocorrem entre alimentos e materiais de embalagem (SHAHBAZIKHAH *et all.*, 2011).

Segundo Marcilla *et all.* (2004), pode ocorrer a migração dos plastificantes de PVC para os meios de contatos tais como gás, líquido ou sólido, através de catéteres, máscaras para nebulizações, bolsas de sangue, alimentos embalados com PVC, brinquedos plásticos, sapatos e roupas, enfim, quaisquer materiais que tenham sido produzidos utilizando o policloreto de vinila com aditivos plastificantes.

Devido à ausência de ligação química entre as cadeias poliméricas e as moléculas do plastificante, ocorre então a migração gradual do ftalato adsorvido ao policloreto de vinila para ambiente circundante. Os plastificantes formam ligações fortes do tipo ligações de hidrogênio na malha polimérica do policloreto de vinila. Dessa forma, os ftalatos ao longo do tempo podem ser lixiviados para o ambiente, especialmente se aquecidos (PSILLAKIS *et all.* 2004), o que promove mudanças significativas nas propriedades físicas e mecânicas do material policloreto de vinila/plastificante (BENJAMIN *et all.* 2015).

Porém, alguns ftalatos apresentam restrição de uso para algumas aplicações, já que estudos em roedores demonstraram potencial carcinogênico e mutagênico nestes (HEUDORF; MERSCH-SUNDERMANN; ANGERER, 2007). Os ftalatos migram através das membranas das organelas e perturbam a composição e estado físico do microambiente lipídico ao redor de certas enzimas. Como a resposta da ligação específica membrana-enzima está sujeita a mudanças devido à fluidez da membrana, estes compostos se tornam tóxicos para nível organelar em baixas concentrações Bell (1982).

1.1.2- Toxicologia dos Ftalatos

Ftalatos são considerados contaminantes e estão presentes em produtos de higiene pessoal, hormônios e subprodutos industriais. São considerados compostos de desregulação

endócrina, carcinogênicos e de toxicidade reprodutiva (PETROVIC *et al.* 2002; PETRIE *et al.*, 2015), além de serem classificados entre os de maior nível no ambiente em relação a outros compostos de desregulação endócrina (SÁNCHEZ-AVILA *et al.* 2012).

Segundo Bisket e Lester (2003) os efeitos e os dois principais modos de ação dos ftalatos são mimetizador ou bloqueador dos hormônios endógenos. Quando a substância se liga ao receptor celular produzindo uma resposta chamada de agonista, ou seja, o agente exógeno irá agir em um momento errado ou provocar superprodução da resposta trata-se da ação mimetizador. Quando ocorre a ação bloqueadora a resposta obtida será menor em relação a resposta natural ou sem reposta, pois o agente exógeno bloqueará a ação do hormônio natural com o seu receptor.

Kato *et al.* (2004) informaram que a população em geral está exposta ao DEHP através da água, dos alimentos e do ar, por meio da inalação e da ingestão. Entretanto, as pessoas que são submetidas a tratamentos médicos como transfusões e diálises estão mais expostas ao DEHP do que a população em geral devido ao íntimo contato com equipamentos ou materiais hospitalares plásticos.

Dhanya *et al.* (2003) observou uma inibição significativa da atividade da membrana Na(+)-K⁺ ATPase do fígado e do cérebro e os testes histopatológicos do cérebro revelaram áreas degeneradas ao ser ministrados 0,75%/100g de peso em ratos. Contudo observou-se que o efeito era reversível com a suspensão da dose administrada. Se consideramos pacientes com intoxicação por transfusão o efeito é minimizado diante ao pouco tempo de exposição, o problema, porém está em pacientes expostos por longo tempo, como os de talcemia e hemodiálise, o risco é preocupante.

A Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) estabeleceu um limite máximo de ftalatos em água em 6.10^{-3} mg.L⁻¹, e o uso de plastificantes em produtos infantis que podem ser levados à boca foi proibido (CHEN *et al.* 2004). A OSHA (*Occupational Safety and Health Administration*) admite 850.10^{-3} mg. g⁻¹ para o DBP e 5.10^{-3} mg.g⁻¹ para o DEHP como níveis aceitáveis de exposição em ambiente de trabalho. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) denota que plastificantes não devem conter mais que 1% em peso de ftalato de dibenzila, e para embalagens de alimentos que contenham mais de 5% de gordura, o uso é permitido até o limite de 3% da matéria plástica.

Gangi (1999) revelou a presença de DEHP em níveis elevados, em uma amostra de produtos médicos em PVC comercializados em 12 países, inclusive no Brasil. Da mesma forma que em brinquedos, produtos médicos de PVC flexível facilmente liberam o DEHP para os fluidos circunvizinhos. Isto ocorre em dispositivos como bolsas com soluções para

uso intravenoso. WEUVE *et all.* (2006) enfatizaram que a estimativa de exposição de crianças ao DEHP a partir de materiais e 7 componentes utilizados em unidades de terapia intensiva (UTIs) excede a exposição diária típica de um adulto ($3-30.10^{-3}$ mg/kg de peso corporal/dia) por uma ou duas ordens de magnitude, aproximando-se do menor nível onde já se observam efeitos adversos em estudos com animais (14-23 mg/kg de peso corporal/dia). Adicionalmente, a suscetibilidade de neonatos nas UTIs a altas exposições ao DEHP pode ser associada à redução na habilidade de eliminação dos ftalatos.

O metabolismo das crianças difere dos adultos, sendo as crianças mais sensíveis aos efeitos causados pelo DEHP. Sua contaminação oral pode ocorrer pela ingestão de leite materno, alimentos infantis armazenados em embalagens que migrem o plastificante, migração do composto existente em brinquedos, utilização de tubulações médicas (Latini *et all.* 2004). Foi observado também a presença de DEHP e ftalato de mono-(2etil -hexila) (MEHP), metabólito resultante da degradação do DEHP, em plasma materno, no cordão umbilical (LATINI *et all.* 2003), além da capacidade do DEHP de atravessar a parede placentária (MAGLIOZZI *et all.* 2003). Países como a Áustria, Alemanha, Dinamarca, França, Noruega, Finlândia e Suécia retiraram os ftalatos dos brinquedos infantis para menores de 3 anos (GREENPEACE INTERNATIONAL 1997), enquanto a Grécia banuiu todos os brinquedos de PVC macios. Pesquisas laboratoriais identificaram uma grande variedade de efeitos crônicos dos ftalatos (GREENPEACE INTERNATIONAL 1997): lesões de rim e fígado; anormalidades reprodutivas, incluindo atrofia testicular; desenvolvimento alterado de tecidos reprodutivos e efeitos na produção de esperma; transformações de células e cânceres variados.

SEGUNDO (WAHL *et all.* 1999) os pacientes que necessitam de hemodiálise representam um grande grupo de risco quanto a intoxicação com DEHP, pois estes ficam expostos por um longo tempo em contato aos tubos de PVC que apresentam em torno de 40% deste plastificante. WAHL *et all.* (2004) avaliaram a presença do metabólito 4-heptanone proveniente do DEHP e detectou sua presença no plasma de pacientes de hemodiálises, sendo $95,9 \mu\text{g L}^{-1}$ contra $10,4.10^{-3}\text{g. L}^{-1}$ nos pacientes controles, nos pacientes diabéticos não foi encontrado diferença quando comparado com os controles.

1.2- A legislação brasileira para os ftalatos

Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) são os principais órgãos que estabelecem os regulamentos, normas e quantidades dos ftalatos a serem adotados nos mais variados produtos plásticos, são: A Anvisa na Resolução nº 105, de 19 de maio de 1999, publicada no Diário Oficial da União (DOU) no dia 20/05/1999, apêndice I - Restrições de uso, limites de composição e especificações, estabeleceu que as embalagens com os plastificantes não devem conter mais que 1% em peso de ftalato de dibenzila. No mesmo ano (1999), o Brasil deu os primeiros passos para a resolução, na União Europeia já havia sido proibido o uso de ftalatos em brinquedos que são levados à boca das crianças abaixo de três anos de idade. Após um ano, a Portaria nº. 116ª/2000, de 3 de março constatou a existência de riscos para a saúde e segurança dos consumidores, designadamente crianças resultantes da utilização de certos artigos de puericultura e brinquedos fabricados em PVC maleável, em cuja composição se encontram determinados ftalatos.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) divulgou nota técnica afirmando que, segundo a avaliação do IARC (*International Agency for Research on Cancer*), órgão ligado à Organização Mundial da Saúde (OMS), em fevereiro de 2000, o DEHP, assim como o DEHA (adipato de di-2-etilexil) foram classificados como substâncias do grupo 3, (risco cancerígeno para seres humanos não classificável), isto é, risco ainda não evidenciado para seres humanos. No entanto, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) relacionou o DEHP e o DEHA ao desenvolvimento de câncer de fígado e problemas de fertilidade em testes com animais (ANVISA, 2000).

Muitos países preocupados quanto à exposição de crianças de pouca idade ao uso do DEHP, restringiram o uso deste ftalatos em brinquedos de PVC. Voluntariamente a indústria de brinquedos americana interrompeu o uso de DEHP em brinquedos que podem ser levados à boca em 1986 (ASTM, 1986). A legislação brasileira é lenta quanto a proibição do uso de ftalatos e demorada nas ações, enquanto que em outros países a sua utilização desde já era proibida.

1.3- Água de hemodiálise

LUKE, R.G. (2005) relata que a insuficiência renal crônica é caracterizada por perda progressiva e geralmente irreversível da função renal de depuração, o rim não consegue realizar sua função filtradora, isto é, retirar do sangue todas as escórias metabólicas. A falência renal acontece a qualquer momento da vida e afeta qualquer pessoa. A doença normalmente progride de forma lenta, mas gradual, resultando em múltiplos sinais e sintomas decorrentes da incapacidade do rim de manter a homeostasia interna (SILVA, SILVA, 2003).

Dentre as modalidades de tratamento para a insuficiência renal, a hemodiálise é um processo realizado em um circuito extracorpóreo, utilizando-se uma membrana artificial. Um ou mais vasos sanguíneos do paciente são puncionados para que o sangue percorra um circuito tubular e passe pelo filtro, que contém grande número de pequenos capilares, constituídos por um material que serve como membrana semipermeável, banhados externamente pela solução de diálise (ENGEL, C. L. *et al.* 2005). A hemodiálise promove a retirada das substâncias tóxicas, água e sais minerais do organismo, mediante a passagem do sangue por um filtro, são em geral realizadas três vezes por semana em sessões com duração média de 3 a 4 horas, com auxílio de uma máquina em clínicas de hemodiálise. Diálise e o transplante renal (TX), são tratamentos que substituem parcialmente a função renal, aliviam os sintomas da doença e preservam a vida do paciente, porém, nenhum deles é curativo (THOMÉ *et al.* 1999).

A água utilizada na hemodiálise deve ser amplamente controlada para manter o padrão de segurança e qualidade. Portanto, precisa receber tratamento especial antes de ser utilizada no preparo da solução de diálise, obedecendo rigorosamente os padrões normatizados pela Resolução da Diretoria Colegiada – RDC. 154, de 15/06/04. Sendo a hemodiálise uma terapia na qual o maior insumo consumido é a água, a maior preocupação com a qualidade, se refere aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos deste insumo (PEREZ- GARCIA, 2001). Sob o ponto de vista sanitário a inobservância dos riscos de contaminação, bem como práticas inadequadas nesta água, imprime graves consequências aos pacientes em hemodiálise.

Todas as substâncias de pequeno peso molecular presentes na água têm acesso direto à corrente sanguínea do paciente, levando ao aparecimento de efeitos adversos, muitas vezes letais. Por essa razão, é muito importante que a pureza da água utilizada para diálise seja conhecida e controlada (RAMIREZ, 2009). Presença de contaminantes químicos evidencia

que o sistema de tratamento não foi eficiente para remoção dos contaminantes, qualidade da água de alimentação, por dimensionamento inadequado do sistema de tratamento, deterioração progressiva dos componentes do sistema ou ruptura da membrana da osmose reversa. A água tratada é utilizada para diluir soluções concentradas de sais, conhecidas como concentrados polieletrólíticos. Pacientes urêmicos, em tratamento, são expostos a volumes de água que variam entre 18.000 a 36.000 litros por ano (SILVA, A. M. M. *et al.*. 1996).

De acordo com a OMS o suprimento de água seguro é aquele que não representa nenhum risco significativo a saúde. A grande maioria dos problemas de saúde relacionados a água é resultado de contaminação microbiológica, entretanto, com relação a água utilizada nos processos de diálise, a presença de contaminantes químicos e biológicos tem papel fundamental. Caso exista estes contaminantes eles apresentam uma relação com doenças e sintomas, pelos quais podemos verificar conforme Tabela 2. Vários contaminantes presentes algumas vezes na água, utilizada para se fazer a solução dialítica são prejudiciais aos pacientes. A presença, por exemplo, de grandes quantidades de cálcio e magnésio na água não tratada produzem um quadro chamado “síndrome da água dura” que se caracteriza pelo aparecimento de náuseas, vômitos, letargia, fraqueza muscular intensa e hipertensão arterial. O magnésio confere dureza à água do dialisato quando em excesso provocando o bloqueio da transmissão neuromuscular (PEGORARO, 2005).

Tabela 2 Relação entre sintomas e contaminantes.

CONTAMINANTES	SINAIS E SINTOMAS
pH baixo, sulfatos	Acidose metabólica
Bactérias, cálcio, cobre, endotoxinas,	Náuseas, vômitos
pH baixo, magnésio, nitratos, sulfatos, zinco	
Alumínio, cloraminas, cobre, zinco	Anemia
Bactérias, endotoxinas, nitratos	
Cálcio, magnésio	Cálcio, magnésio
Cálcio, sódio	Hipertensão
Bactérias, endotoxinas, nitratos	Hipotensão

Fonte: Adaptada de SIMÕES *et al.*(2005).

A Tabela 2 não descreve nenhum ftalatos como um possível contaminante, percebe-se que a toxicidade e a problematização advinda de agentes químicos como os ftalatos não estão no foco na manutenção da qualidade da água de hemodiálise.

Os métodos de tratamento da água para uso em hemodiálise devem ser adequados para produção da água caracterizada como “água para injetáveis” – água tipo I – de acordo com o sistema de obtenção preconizado e estabelecido nas edições vigentes da Farmacopeia Europeia e da Farmacopeia dos Estados Unidos da América – USP. Os métodos de tratamento preferenciais são a deionização e a osmose reversa (PEGORARO, 2005; LEME; SILVA, 2003).

Geralmente, os métodos de purificação, consistem no pré-tratamento ou preparatório e pós-tratamento da água. O processo preparatório da água potável deve ser eficaz, retendo grande parte das impurezas orgânicas e químicas, evitando danos às membranas de osmose reversa. (BUGNO *et all.* 2007). Esse método consiste em filtrar, abrandar, adsorver substâncias através de carvão ativado. Os filtros mecânicos removem corpúsculos e resíduos presentes na água, utilizando um filtro de cartucho com porosidade que varia entre 5 a 25 microns, ou um filtro sedimentação que retira impurezas e sedimentos presentes na água de entrada (RAMIREZ, 2009).

1.4- Microextração líquido líquido Dispersiva (DLLME)

O preparo de amostra adequado é um passo fundamental para qualquer procedimento analítico (PAN *et all.* 2014). Os principais objetivos do preparo de amostra são promover a extração, também muitas vezes, aumentar a concentração dos analitos de interesse (pré-concentração), e a remoção, tanto quanto possível, dos interferentes (*clean-up*). Essa é a etapa mais onerosa e demorada envolvida no processo analítico, consumindo o maior tempo da análise, além de ser a etapa mais propensa a ocorrência de erros, perdas de analitos e contaminações (JARDIM, 2010).

O desenvolvimento de novas técnicas de preparação de amostra com base na miniaturização dos métodos tradicionais tem sido de grande interesse dos pesquisadores: microextração em fase líquida (LPME) e microextração em fase sólida (SPME) (CARASEK; MERIB, 2015; PŁOTKA-WASYLKA *et al.* 2015; SPIETELUN *et all.* 2014). Visto que a miniaturização das técnicas de preparo de amostras era o fator chave para alcançar estes objetivos (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010), Arthur e Pawliszyn (1990) despertaram o

interesse dos analíticos com o desenvolvimento da microextração em fase sólida (SPME, do inglês, *Microextraction Solid-Phase*) (ARTHUR; PAWLISZN, 1990). Baseada na extração dos analitos a partir de uma fibra de sílica como material adsorvente (FARAJZADEH; KHOSHAMARAM; SHEYKHIZADEH, 2014), a eficiência da extração depende do revestimento desta fibra e dos coeficientes de partições dos analitos de interesse (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010). Como o revestimento das fibras são fatores importantes na SPME, isso se torna também uma desvantagem, pois gera uma relação de dependência de fornecedores para a concessão das fibras, além de apresentarem também limitações no uso de determinados solventes entre outras o (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010; SARAFRAZ-YAZDI; AMIRHASSAN, 2010). A microextração em fase líquida (LPME do inglês, *Microextraction Liquid-Phase*), foi desenvolvida nos meados da década de 90, seu princípio baseia-se em um menor uso de solventes orgânicos, na ordem de microlitros (μL), chamada de fase aceptora, a fim de extrair os analitos provenientes de uma matriz aquosa (fase doadora) (SARAFRAZ-YAZDI; AMIRHASSAN, 2010).

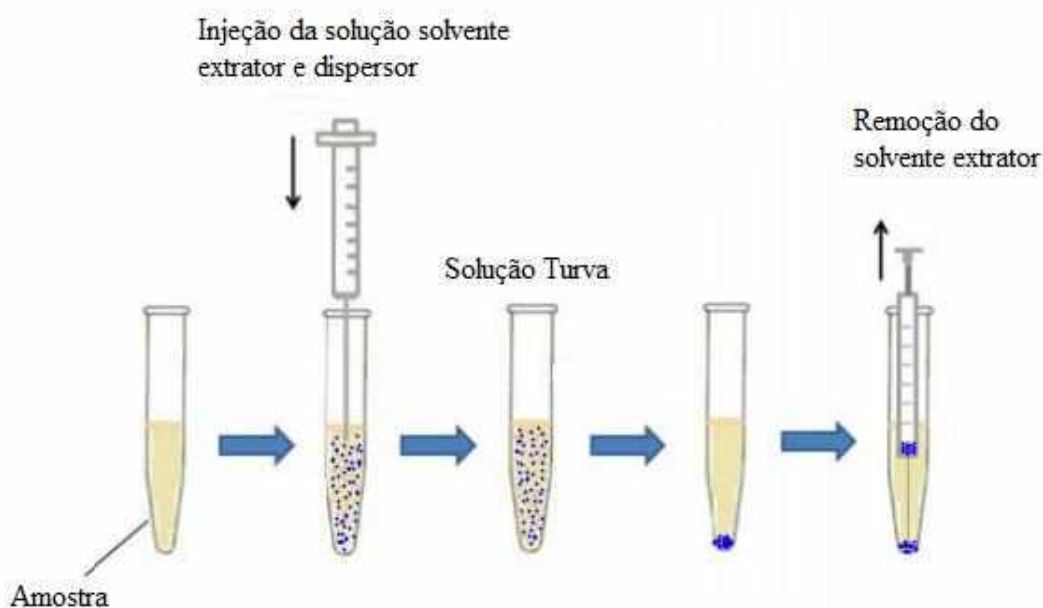
Assim, a LPME foi dividida em três principais categorias: i) microextração em gota suspensa (SDME, do inglês, *Single Drop Microextraction*); ii) microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês, *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) e, iii) microextração em fase-líquida com fibras ocas (HF-LPME, do inglês, *Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction*) (SARAFRAZ-YASZDI; AMIRHASSAN, 2010). A maioria das técnicas de LPME necessita de um tempo longo para alcançar o estado de equilíbrio, devido à pequena área de contato entre a amostra e o solvente extrator, o que afeta de forma negativa os fatores de enriquecimento. A DLLME supera essas limitações (CRUZ-VERA *et al.* 2009). Dentre estas, a DLLME é uma das técnicas que vem recebendo atenção e se destacando na área de preparo de amostras (HERRERA *et al.* 2010).

A DLLME é uma técnica de microextração, desenvolvida por (REZAEI *et al.* 2006) qual é constituída por um sistema ternário de solventes: solvente extrator, solvente dispersor e fase aquosa. É um método de separação e pré-concentração pelo qual baseia-se na partição dos analitos utilizando pequenas quantidades de solventes dispersores extratores, os quais fazem parte de duas fases imiscíveis uma aquosa e a outra orgânica. Consiste no equilíbrio de distribuição do analito entre as fases doadora (amostra) e aceptora (solvente orgânico) e é ideal para a extração de compostos com propriedades lipofílicas moderadas a altas ou que possam ter seu coeficiente de distribuição ($\log D$) alterado pelo controle do pH (analitos ionizáveis) (MARTINS *et al.* 2012) (ZANG *et al.* 2009). Seu estado de equilíbrio é alcançado rapidamente, devido à utilização de um sistema ternário de solventes (amostra

aquosa, solvente dispersor e solvente extrator), o que torna a extração independente do tempo. A razão entre o volume de fase aceptora e de fase doadora é da ordem de microlitros e mililitros, respectivamente, o que permite a obtenção de altos valores de enriquecimento (FARAJZADEH; SOROURADDIN; MOGADDAM, 2015; REZAEI *et al.* 2006).

O procedimento desta técnica consiste em uma injeção rápida, utilizando uma seringa, contendo uma mistura de solvente extrator e solvente dispersor, dentro da fase aquosa que conterá o analito de interesse. Esta injeção “brusca”, levará à formação de uma emulsão no interior do tubo cônico (água / solvente extrator / solvente dispersor) composto por inúmeras gotículas de solvente extrator as quais estão dispersas na solução aquosa, permitindo a extração do analito em poucos segundos. Isto pode ser explicado devido à formação de uma infinita área superficial entre as gotículas de solvente extrator e as gotículas da fase aquosa, alcançando o estado de equilíbrio rapidamente. Após a centrifugação, a quantificação do analito na fase sedimentada (FS) é analisada conforme a técnica analítica mais apropriada (HU; WU; QI-FENG, 2010; REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010; SARAFRAZ-YAZDI; AMIRHASSAN, 2010; MA; LU; CHEN, 2012). As etapas da técnica encontram-se ilustradas na figura 3.

Figura 3 Esquema representativo envolvendo as etapas da DLLME.



Fonte: Adaptada de Moreira; Yokoya; Gaitani, (2014).

A Figura 3 ilustra o procedimento, que é baseado no processo de distribuição de equilíbrio do analito entre as fases aquosa e extratora (SARAJI; BOROUJENI, 2014). A DLLME vai apresentar uma boa aplicabilidade se o analito for altamente ou moderadamente de caráter hidrofóbico (apresentando coeficiente de distribuição maior que 500. Uma boa alternativa para aumentar o característica lipofílica do analito é a adição de agentes complexantes, ou também ajustes de pH (ZANG *et all.* 2009).

1.4-1 Principais parâmetros que afetam a eficiência da DLLME

Trabalhos publicados por Caldas *et all.* (2011), Melwanki *et all.* (2009) e Moreira *et all.* (2014), demonstraram que fatores como solvente de extração, solvente de dispersão, volumes dos solventes de extração e dispersão, tempo de extração, força iônica e pH da amostra são imprescindíveis para uma boa eficiência da extração por DLLME .

Figura 4 Principais parâmetros que afetam a eficiência da DLLME.



Fonte:(Moreira; Yokoya; Gaitani (2014)

A seleção do solvente extrator apropriado é o parâmetro mais importante desta técnica de extração (ZANG *et al.* 2009). Na prática, ele representa cerca de 1-3% do volume total da mistura de solventes utilizada (BOSCH OJEDA; SÁNCHEZ ROJAS, 2009). É necessário que o solvente extrator apresente características desejáveis tais como densidade maior que a da água, para permitir a formação da fase sedimentada; uma temperatura de ebulição relativamente alta e uma pressão de vapor relativamente baixa, a fim de evitar perdas de solvente durante o processo de extração e baixa solubilidade em água, permitindo a separação adequada do solvente orgânico. Além disso, o solvente extrator deve ter capacidade de extração dos analitos de interesse e de formar dispersão na forma de microgotas na presença do solvente dispersor, além de ser adequado à técnica analítica escolhida (Borges *et al.* 2015). (Rezaee *et al.* 2006) relata que o aumento do volume do solvente extrator promove um aumento do volume da fase sedimentada e, embora a recuperação permaneça quase constante, o fator de enriquecimento poderá diminuir, levando a perdas na detectabilidade dos analitos de interesse.

Já o solvente dispersor tem como principal característica ser solúvel tanto na fase aquosa e na fase orgânica. O volume do solvente dispersor afeta diretamente o grau de dispersão do solvente extrator na fase aquosa e, conseqüentemente, a eficiência da extração. Metanol, acetonitrila, acetona, etanol e tetraidrofurano são os solventes dispersores mais usados, o seu volume afeta diretamente a turvação da solução e conseqüentemente a eficiência da extração (REZAAEE *et al.* 2006) (HUO *et al.* 2011) (YAN *et al.* 2011). Nos trabalhos de Yan *et al.* (2011) e Farajzadeh *et al.* (2012) foi observado que o aumento do volume de solvente dispersor promoveu o aumento da solubilidade do solvente extrator na amostra com conseqüente diminuição do volume de fase sedimentada. Portanto, o volume ótimo de solvente dispersor é o que garante um alto fator de concentração e, ao mesmo tempo, permite um volume de fase sedimentada suficiente para as análises necessárias (HADJMOHAMMADI; GHOREISHI, 2011).

O pH da amostra é um parâmetro essencial porque afeta tanto a eficiência da extração como a seletividade da DLLME (MENG *et al.* 2011). Em se tratando por exemplo de analitos básicos para que tenha uma melhoria na eficiência de extração é necessário que o pH da amostra fique acima do seu valor de pKa, evitando a sua ionização e aumentando a tendência de serem extraídos pelo solvente extrator. (SARAJI; BOROUJENI, 2014). No trabalho de Melwanki *et al.* (2009), por exemplo, foi necessária a adição de amônia na

amostra de urina para facilitar a partição do 7-aminoflunitrazepam para o solvente extrator com o objetivo de melhorar a recuperação.

Outro parâmetro de interesse é a força iônica da amostra. A adição de sal pode promover melhora no rendimento da extração (SARAJI; BOROUJENI, 2014) devido à diminuição da solubilidade dos compostos de interesse na fase aquosa e aumento de sua transferência para a fase orgânica (HUO *et al.* 2011). Esse fenômeno denominado de *salting out*, no qual moléculas de água formam esferas de hidratação ao redor das moléculas do sal dissociadas, com consequente diminuição da concentração de água disponível para dissolver as moléculas do analito (MELWANKI *et al.* 2009). Contudo, essa adição também promove redução na solubilidade do solvente extrator na amostra, o que promove aumento no volume de fase sedimentada e diminuição do fator de enriquecimento (SARAJI; BOROUJENI, 2014).

A técnica da DLLME apresenta algumas vantagens tais como: menor uso de solventes orgânicos, rapidez na execução (apenas uma etapa), simplicidade de operação, baixo custo, alta recuperação do analito e alto fator de enriquecimento, além de possibilitar a aplicação na extração e concentração de grande variedade de compostos orgânicos e em diversas matrizes biológicas, como sangue, urina e plasma. A principal desvantagem citada é o uso de solventes tóxicos e a etapa de centrifugação, que dificulta a automação da técnica (MOREIRA, *et al.* 2014).

Segundo os autores Alshana *et al.* (2013); Rezaee *et al.* (2006); Kawaguchi *et al.* (2008); Kocúrová *et al.* (2012) as desvantagens da técnica estão no uso de solventes tóxicos, todo o processo de extração é manual e a centrifugação limita o volume de amostra a ser utilizado. Esta etapa que demanda maior tempo no processo e dificulta a automação da técnica. No entanto, modificações experimentais têm superado muitas destas desvantagens (KOKOSA, 2013).

1.5- Cromatografia

A cromatografia é um método físico-químico capaz de separar componentes de uma amostra, pela distribuição destes componentes entre duas fases. Uma das fases está fixa, enquanto a outra passa através dela. A amostra é introduzida no equipamento e conduzida pela fase móvel (líquida ou gasosa). Durante a passagem da fase móvel através da fase

estacionária (líquida ou sólida), os componentes da amostra são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que, cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em uma migração diferencial que promove a separação (PECSOK E SHIELDS, 1968; EDWARDS, 1970; COLLINS, 1988; JAMES, 1995; COLLINS *et al.*(2006).

A cromatografia gasosa recebe este nome devido ao fato da fase móvel (também chamada de gás de arraste) utilizada ser um gás (SKOOG *et al.*2002; COLLINS *et al.*2006). Os principais componentes de um cromatógrafo gasoso são: sistema de gases, sistema de injeção da amostra, coluna cromatográfica, detector e registrador (SKOOG *et al.* 2002; Soares, 2006).

A Cromatografia a Gás (GC) é uma técnica utilizada na separação de substâncias gasosas ou volatilizáveis. A volatilidade dos compostos pode ser conseguida aumentando-se a temperatura no local de injeção da amostra e na coluna, ou derivando-se os compostos em outros, mais termicamente estáveis e apolares (EDWARDS, 1970; CIOLA, 1973; COLLINS, 1988; Collins *et al.* 2006; SOARES, 2006).

Dentre os métodos analíticos o mais utilizado para determinação de compostos desruptores endócrinos, em especial os ftalatos, é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (PETROVIC *et al.* 2002; BAGÓ *et al.*2005). A Tabela 3 trás algumas amostras e técnicas de extração diversas, em sua maioria analisadas em Cromatografia a Gás como evidencia a literatura.

Tabela 3 Métodos citados na literatura para extração e análise dos ftalatos.

Matriz	Extração	Análise	Referência
Água	Microextração Dispersiva em Fase-líquida	Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização em chama (GC-FID)	Zakharkiv <i>et al.</i> (2015)
Solo e Iodo de Esgoto	Solvente pressurizado	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)	Khosravi e Price, (2015)

Solo	Extração sólido-líquido	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa em tandem (GC-MS-MS)	Pirogov <i>et al.</i> (2014)
Água	Extração Líquido-Líquido	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)	Mohammed <i>et al.</i> (2013)
Aminoácidos/ cabelo, urina	UA-DLLME	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)	Mudiam e Ratnasekhar, (2013)
14-Disruptores endócrinos/ urina	Agitação manual DLLME	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)	Vela-soria <i>et al.</i> (2014)
Derivados de piridina/ urina	Extração por eletromembrana associada a (ultrasound-assisted-DLLME)	Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização em chama (GC-FID)	Arjomandi e Behzad <i>et al.</i> (2014)

Fonte: A autora

Conforme denota alguns exemplos citados na Tabela 3 as técnicas mais empregadas para análise de ftalatos são: cromatografia gasosa acoplada ao detector de espectrométrico de massa (MS) ou de ionização em chama (FID).

2- OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Objetivo deste trabalho foi avaliar sistema de extração em fase líquida via DLLME, para viabilizar a determinação por GC-FID dos ftalatos em amostras de água de hemodiálise.

2.1-2 Objetivo Específico

- Otimizar as condições cromatográficas para a determinação da mistura dos quatro ftalatos em estudo DEHP, DEP, DMP e DOP;
- Otimizar o tipo e o volume dos solventes extrator e dispersor, pH e a força iônica da solução para realização da DLLME, visando uma maior eficiência da extração e pré-concentração do ftalatos;
- Determinar os parâmetros de mérito: faixa linear, coeficiente de correlação linear (R^2), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), fator de enriquecimento (FE), fator de Pré Concentração (FC) , coeficiente de variação (CV) e avaliar a exatidão do método proposto, por meio de testes de recuperação;
- Aplicar o método para avaliação da migração dos ftalatos em diferentes amostras de água hemodiálise.

3- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 *Limpeza e preparo de vidrarias*

Devido ao risco de contaminação das amostras por ftalatos provenientes de materiais plásticos, em todos os experimentos utilizou-se apenas materiais de vidro. Além disso, para limpeza dos materiais durante os procedimentos, foram seguidos os critérios sugeridos por Lopez-Avila e Beckert (1989). Todo o material utilizado foi lavado com detergente, enxaguado com água em abundância, lavado três vezes com água destilada e finalmente lavado com acetona.

3.2 *Instrumentação*

Os reagentes empregados para o preparo das soluções de trabalho foram pesados utilizando uma balança analítica Shimadzu modelo AUY 220 com precisão de $\pm 0,1$ mg. As soluções foram preparadas a partir de reagentes com grau de pureza analítica Sigma-Aldrich. No preparo das soluções aquosas, foi utilizada água deionizada de alta pureza obtida do sistema de purificação GEHAKA (São Paulo, Brasil) de resistividade 18,8 M Ω cm.

Inicialmente foram preparadas soluções estoque para cada substância DMP, DEP, DEHP, DOP, na concentração de 500,00 mg L⁻¹. e, a partir destas, as soluções de trabalho, tanto individuais quanto da mistura, contendo todos os quatro padrões, em diferentes concentrações. As soluções foram preparadas através da diluição dos padrões DMP, DEP, DEHP, DOP em acetonitrila (ACN) Sigma-Aldrich., as quais foram armazenadas e estocadas em refrigeração.

3.3 *Equipamento e condições cromatográficas*

As análises foram realizadas em um sistema GC (Shimadzu – Modelo 2014), detector por ionização em chamas (FID). A análise foi feita no modo *splitless*. Volume da amostra: 1,0 μ L. A temperatura do injetor foi mantida à 300 °C. O gás de arraste utilizado foi nitrogênio com um fluxo de 2 mL min⁻¹. Foi utilizada uma coluna Supelco Equity^{TM-5} (5 % fenil/95 %

dimetilpolisiloxano) ($30\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$). A temperatura inicial da coluna foi de $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 min, com aumento para $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $9\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, mantida por 3 min. os dados foram analisados no software GC-Solution. a metodologia adaptada foi de (ZAKHARKIV; ZUI; ZAITSEV, 2015).

A fim de se obter a separação de DMP, DEP, DEHP e DOP, preparou-se uma solução da mistura dos quatro ftalatos em ACN, de 100 mg L^{-1} , após obtido a separação dos quatros ftalatos da mistura, injetou-se cada um dos padrões de ftalatos separadamente, para a possível confirmação dos tempos de retenções correspondentes de cada um dos quatros ftalatos.

3.4 Otimização do procedimento de extração por DLLME

A fim de obter boas recuperações foram feitos ensaios de otimização dos parâmetros envolvidos na DLMME, pois estes estudos afetam diretamente a eficiência do método. Uma alíquota de 5 mL de água deionizada foi diretamente pipetada para tubos de vidro com fundo cônico, e com o auxílio de uma microseringa injetou-se rapidamente $1000\text{ }\mu\text{L}$ da mistura de extrator/dispersor, contendo 200 e $800\text{ }\mu\text{L}$ de clorofórmio e metanol respectivamente. As gotículas do solvente extrator depositados no fundo do tubo contendo o DMP, DEP, DEHP e DOP, foram retiradas com o auxílio de uma microseringa. Depois foram injetadas $1\text{ }\mu\text{L}$ no GC, as medidas foram realizadas em triplicatas e expressas como média \pm desvio padrão.

As etapas do procedimento da técnica da DLLME esta relatado na Figura 5, onde ocorrerá a partir de uma injeção rápida de uma mistura de solventes extrator e dispersor na solução aquosa contendo os quatro ftalatos em estudos, após injeção ocorrerá a turvação seguida de formação de microgotas (sistema ternário) que sedimentaram no fundo do vidro como mostrado na etapa .

Figura 5. Formação do sistema ternário e da fase sedimentada após injeção da mistura extrator/dispersor na amostra.



Fonte: A autora

Nota; a) Injeção do da mistura do solvente extrator e dispersor na solução aquosa contendo os analitos, b) Turvação da mistura, c) Formação do sistema ternário; d) Sedimentação do analito no solvente extrator.

3.4.1- Solventes extrator

Para escolha do melhor solvente extrator foram realizados ensaios utilizando, tetracloreto de carbono, xileno, hexano, 1-dodecanol e clorofórmio, combinados inicialmente com metanol (solvente dispersor) em 5 mL de água deionizada fortificada com $500 \mu\text{g L}^{-1}$ da mistura de DMP, DEP, DEHP, DOP. Para o procedimento de extração foram utilizados 200 μL de solvente extrator com 800 μL de solvente dispersor.

3.4.2- Solventes dispersor

Para escolha do melhor solvente dispersor, atendendo a característica de ser solúvel tanto na amostra quanto no solvente extrator, foram selecionados acetonitrila, acetona, etanol e metanol. Foram realizados experimentos utilizando 5 mL de água deionizada fortificada

com $500 \mu\text{g L}^{-1}$ da mistura de DMP, DEP, DEHP, DOP. Para a extração foram utilizados 200 μL de solvente extrator (clorofórmio) e 800 μL de solvente dispersor.

3.4.3- Volume do Solventes extrator

Para seleção do volume de solvente extrator, foram realizados ensaios de extração em água deionizada fortificadas com $500 \mu\text{g L}^{-1}$ da mistura de DMP, DEP, DEHP, DOP com diferentes volumes de solvente extrator 100, 120, e 150 μL . Para a extração foram utilizados 800 μL de etanol como solvente dispersor e clorofórmio como solvente extrator.

3.4.4- Tempo de extração

Segundo Rezaee *et al.* (2006) o tempo de extração é definido pelo intervalo entre a injeção da mistura dos solventes extrator e dispersor antes da etapa de centrifugação. Por ser o tempo de extração, um dos fatores muito importantes em processos de extração na DLLME. O efeito do tempo de extração dos analitos foi avaliado no intervalo de 1 a 720 minutos, a partir de uma amostra de 5 mL fortificada com $500 \mu\text{g L}^{-1}$ da mistura de DMP, DEP, DEHP, DOP.

3.4.5- Adição do sal

Um dos Fatores relevantes de se avaliar em DLLME é o efeito *salting out/ salting in*, pois pode impulsionar a saída do analito da fase aquosa, ou de favorecer sua permanência, respectivamente assim como influenciar a partição dos solventes utilizados no processo de extração (FRIEDMAN, 2013). Para investigar este parâmetro, vários experimentos foram realizados com a adição de diferentes proporções do sal NaCl variando de 0,2 a 0,6 % (m/v) na amostra.

3.4.6- Agitação mecânica

O uso do ultrassom para facilitar a extração também foi avaliado, pois estudos mostram que o banho ultrassônico aumenta a eficiência de extração, uma vez que microgotas menores são produzidas quando a vibração ultrassônica é empregada.

3.5 Validação do método

Após a otimização do método de extração por DLMME e estabelecidas as melhores condições de separação da mistura dos quatro ftalatos no sistema cromatográfico, foi feita a validação do método por meio da determinação das figuras de mérito: seletividade, linearidade e faixa linear de trabalho, limites de detecção e quantificação, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e robustez.

3.5.1 Curvas analíticas

Foi construída uma curva de calibração analítica para soluções padrão sem e com etapa de pré-concentração. A curva do padrão em um intervalo de concentração da solução de ftalatos DMP, DEP, DEHP e DOP, variando entre 40 e 125mg L⁻¹ em ACN. A curva analítica com pré-concentração, foi realizada pelo método DLMME proposto e otimizado, em um intervalo de concentração da solução de ftalatos (DMP, DEP, DEHP e DOP) variando entre 40 e 125mg L⁻¹. Cada ponto da curva foi injetado três vezes no sistema cromatográfico e a partir dessas injeções, realizou-se o cálculo da média das áreas, equação da curva analítica, coeficiente de determinação (R²).

3.5.2 Linearidade e sensibilidade

A curva de calibração é utilizada para avaliar a linearidade do método, que consiste na capacidade de demonstrar, dentro de um intervalo especificado, que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (ANVISA, 2003). Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração da substância deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para concentrações conhecidas. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica ou de calibração (MOREAU et al, 2008), descrita abaixo:

$$Y = ax + b$$

A linearidade do método foi obtida pelo coeficiente de determinação (R^2), obtido através da construção das curvas analíticas, e a sensibilidade foi medida segundo Brito *et al.* (2003) e Lanças (2009), pelo coeficiente angular da equação da reta. O aplicativo Origin 9.0 foi utilizado para a construção dos gráficos.

3.5.2 Ensaios de Recuperação

A recuperação (R) pode ser definida como a quantidade total de analito, em porcentagem, que é transferida para a fase aceptora ao final da extração e depende do volume total da fase orgânica, do volume da amostra, do coeficiente de partição (RASMUSSEN *et al.*; 2004).

A recuperação está relacionada diretamente com a exatidão (BRITO *et al.* 2003), uma vez que está associada a eficiência da metodologia analítica quanto ao processo de extração dos analitos da amostra (LANÇAS, 2009).

Durante a execução desta etapa, pela técnica da DLMME, usou-se 5 mL das amostras de água de hemodiálise fortificadas com soluções padrões mistas de DMP, DEP, DEHP e DOP, obtendo-se soluções com concentrações após pré-concentração de $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, com injeção em sistema cromatográfico a gás. As áreas dos sinais obtidos foram empregadas nas curvas analíticas com pré-concentração, conhecendo o valor das concentrações das amostras, relacionou-se em porcentagem com o valor da concentração inicial da fortificação, obtendo assim os valores de Recuperação de cada uma das amostras.

3.5.3 Fator de enriquecimento (FE)

Para demonstrar a eficiência da extração, Moreira *et al.* (2014) utilizou parâmetros como o fator de enriquecimento (FE). Os valores de FE foram obtidos a partir dos cálculos da divisão do coeficiente angular da curva de calibração analítica da pré concentração, pelo coeficiente angular da curva de calibração sem pré-concentração.

3.5.4 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) foi considerado com a menor concentração do analito de interesse presente na amostra, que quando submetido a todo o processo analítico, produz um sinal definido como o limite de detecção do método Chasin, *et al.*(1998). No presente trabalho foi estabelecido LD experimental, como sendo a menor concentração dos analitos, detectável pelo procedimento, o experimento foi realizado a partir de diluições sucessivas da solução do padrão contendo DMP, DEP, DEHP e DOP, de 40 mg·L⁻¹ até se obter uma relação sinal ruído maior que três.

O limite de quantificação (LQ) foi estabelecido como sendo a menor concentração dos analitos de interesse que pode ser medida com uma precisão estabelecida Chasin, *et al.*(1998). O LQ foi obtido multiplicando por três o valores obtido de LD.

3.5.3 Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão é estimada através do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV), calculada de acordo com a Equação 1:

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100\% \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde: σ = desvio padrão

\bar{x} = média das medidas das determinações áreas.

3.6- Aplicação do Método desenvolvido na água de hemodiálise

3.6-1 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas no setor de hemodiálise do Hospital de Clínicas de Uberlândia (HCU/UFU). As coletas foram feitas em dias diferentes, e no decorrer das etapas

do tratamento da água de hemodiálise, as amostras estão descritas como; Amostra I -Pré-Pré tratamento; Amostra II- Pós- Pré tratamento; Amostra III- Tratada; Amostra IV- Armazenada dia (29/08/2019) ; Amostra V- Armazenada dia (26/09/2019).

Figura 6. Pontos de coleta das amostras da água de hemodiálise no HCU/UF.



Fonte: A autora.

O método otimizado a partir dos parâmetros de eficiência da DLLME, foi aplicado em todas as amostras de água de hemodiálise.

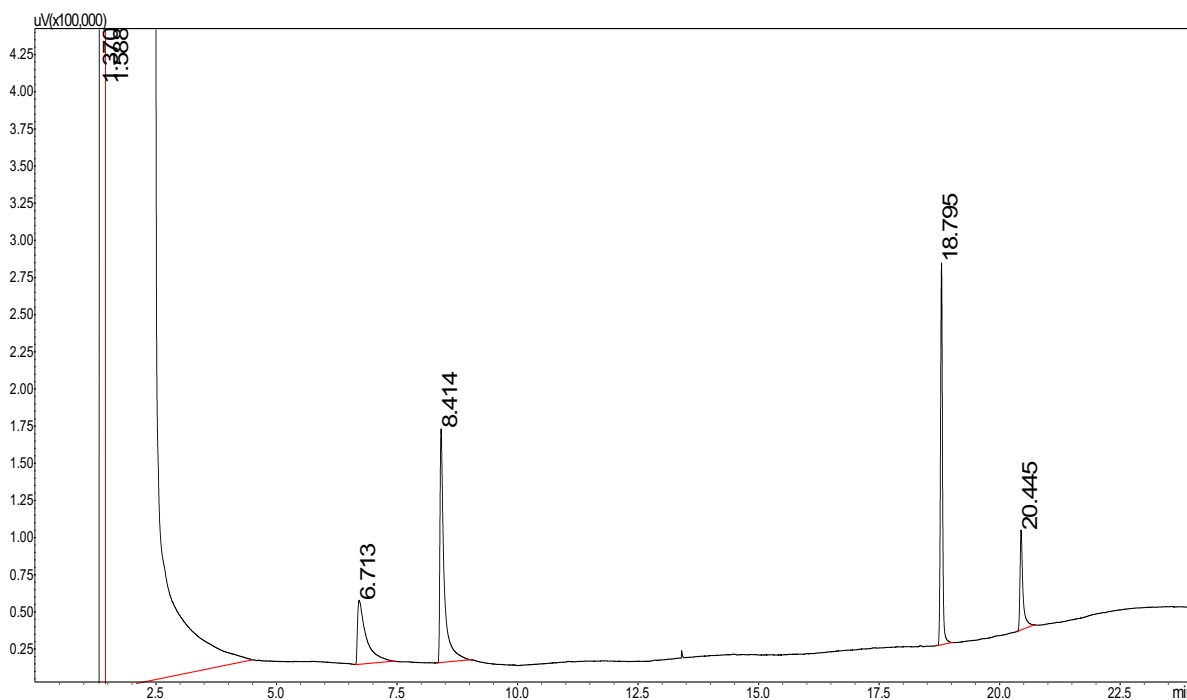
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Separação Cromatográfica dos Ftalatos

Para a separação da mistura dos quatro ftalatos em estudo DMP, DEP, DEHP e DOP, no GC-FID, foram otimizadas as condições cromatográficas através da injeção de

solução padrão contendo os quatro ftalatos. O cromatograma da mistura está representado na Figura 7.

Figura 7. Cromatograma da mistura dos quatro ftalatos DMP, DEP, DEHP e DOP(500 mg L⁻¹ em ACN

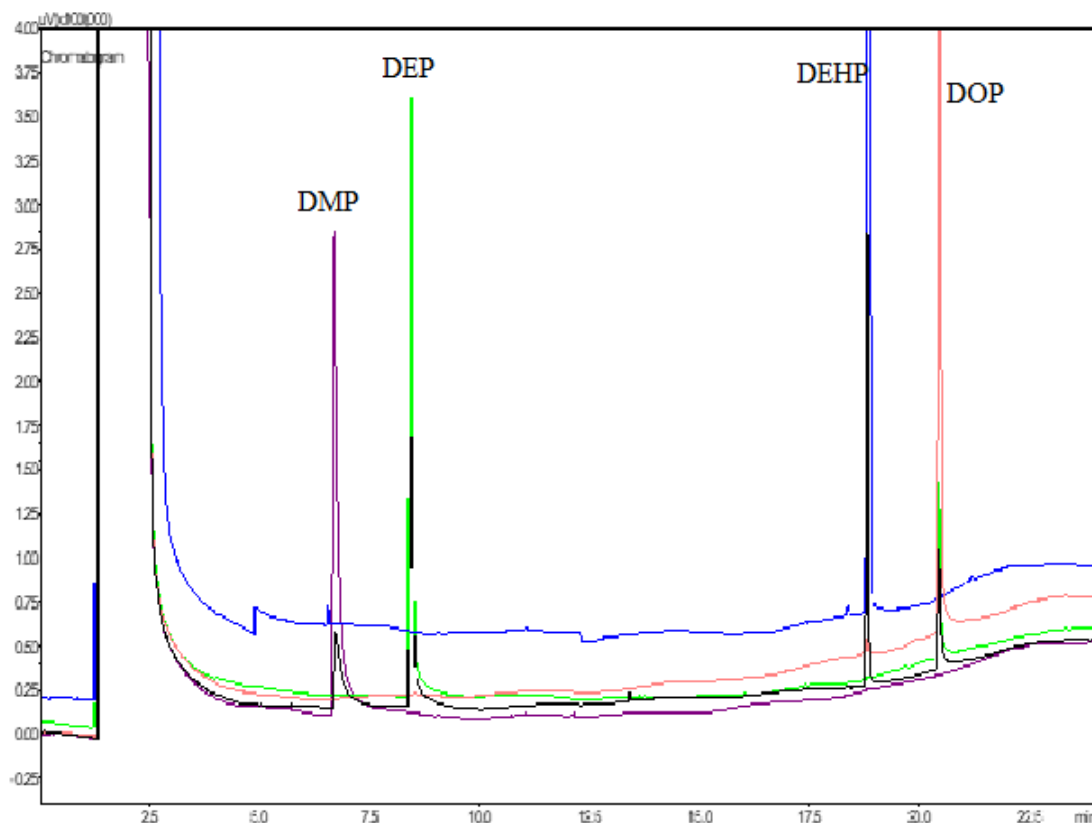


Fonte: A autora.

Nota: Sistema GC (Shimadzu – Modelo 2014), detector por ionização em chamas (FID), no modo *splitless*, volume da amostra: 1,0 μ L, temperatura do injetor foi mantida à 300 °C. O gás de arraste utilizado foi nitrogênio com um fluxo de 2 mL min⁻¹, coluna Supelco Equity^{TM-5} (5 % fenil/95 % dimetilpolisiloxano) (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m), temperatura inicial da coluna foi de 120 °C por 1 min, com aumento para 300 °C a 9 °C min⁻¹, mantida por 3 min. os dados foram analisados no software GC-Solution. a metodologia adaptada foi de (ZAKHARKIV; ZUI; ZAITSEV, 2015).

A fim de obtenção de respostas sobre os tempos de retenções de cada um dos ftalatos, foram injetados DMP, DEP, DEHP e DOP separadamente na concentração de 500mg.L⁻¹ em ACN. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 8.

Figura 8. Cromatogramas dos quatro ftalatos DMP (pico lilás), DEP (pico verde), DEHP (pico azul), e DOP (pico rosa), (500 mg L^{-1}) em ACN.

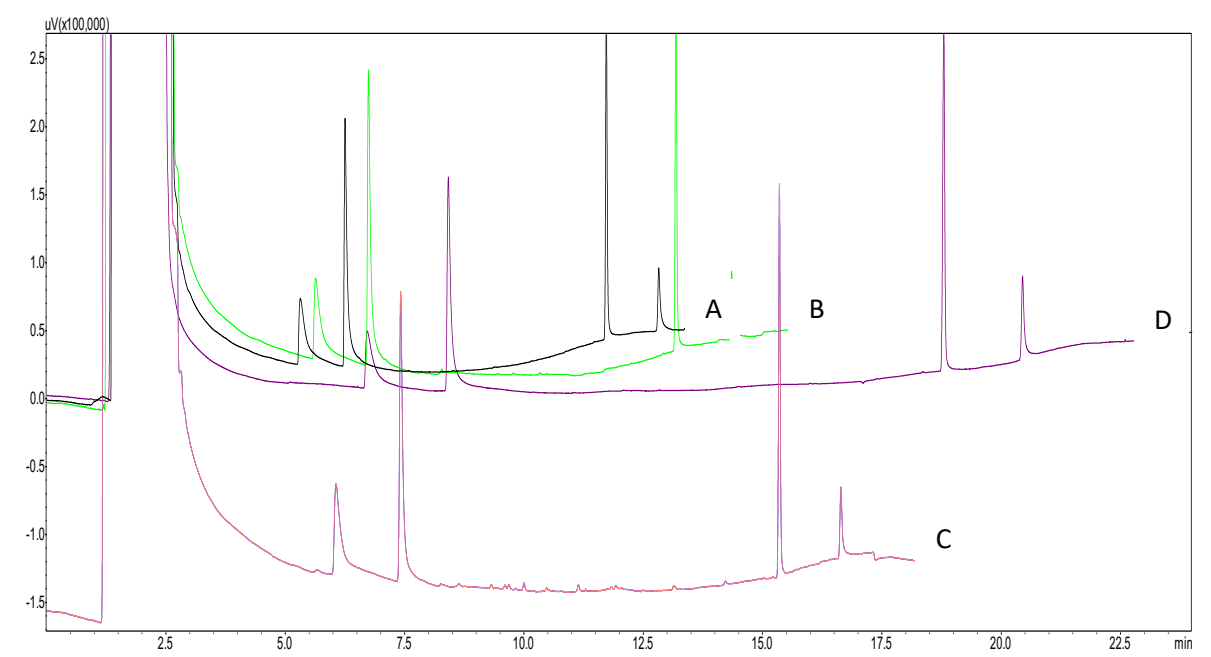


Fonte: A autora.

Com uso da sobreposição do cromatograma da mistura dos quatros ftalatos com o cromatograma dos ftalatos em separados, pode-se conhecer os tempos de retenção do DMP (6,7min), DEP (8,4min), DEHP (18,9 min) e do DOP (20,4min). É importante conhecer os tempos de retenção dos analitos, para uma possível identificação destes em amostras de água de hemodiálise.

Com essas condições de análise no GC-FID a eluição do DEHP ocorrerá cerca de 10 min após o DEP, afim de diminuir o tempo de separação, foi realizado um estudo de rampa de temperatura, mostrado na Figura 9.

Figura 9. Cromatograma de sobreposição em quatro estágios de rampa de temperaturas aplicados na metodologia de separação da mistura dos quatro ftalatos DMP, DEP, DEHP e DOP em ACN (500 mg L^{-1} em ACN), em A: rampa de temperatura (120 até 300°C), com subida da rampa de aquecimento de $18^\circ/\text{min}$, totalizando 14/min, em B: rampa de temperatura (120 até 300°C), com subida da rampa de aquecimento de $16^\circ\text{C}/\text{min}$ totalizando 16min, em C: rampa de temperatura (120 até 300°C), com subida da rampa de aquecimento de $12^\circ\text{C}/\text{min}$ totalizando 19min, em D: rampa de temperatura (120 até 300°C), com subida da rampa de aquecimento de $9^\circ\text{C}/\text{min}$ totalizando 24min.



Fonte: A autora.

Para se obter esta diminuição entre os tempos de retenção DEP e DEHP, foi realizado um estudo com variação da rampa de aquecimento de (120 até 300°C), o gráfico da Figura 9, apresenta a sobreposição de 4 corridas realizadas com a mistura dos quatro ftalatos DMP, DEP, DEHP e DOP em ACN na concentração de 500 mg L^{-1} . Na corrida representada pelo cromatograma (D) o tempo total de análise foi de 24 min, com subida da rampa de aquecimento de $9^\circ\text{C}/\text{min}$, no cromatograma (C) com rampa de aquecimento de $12^\circ\text{C}/\text{min}$ o tempo total de análise foi de 19min, no cromatograma (B), com subida da rampa de aquecimento de $16^\circ\text{C}/\text{min}$ o tempo total de análise foi de 16 min, no cromatograma (A), com rampa de aquecimento de $18^\circ\text{C}/\text{min}$ o tempo total de análise foi de 14 min. O tempo de separação entre o DEP e DEHP foi diminuído em todos os testes, conforme pode-se conferir na Figura 9.

Em valores de concentrações baixos o pico de retenção do DEP e do DEHP se ocorrerá uma sobreposição o que dificultou os cálculos de quantificação dos picos, portanto foi escolhido as condições de rampa de temperatura representadas pela corrida D.

4.2- OTIMIZAÇÕES PARA DLLME

Existem parâmetros muito importantes quanto se trata do processo de extração utilizando o método da DLMME. Entre estes estão o tipo e volume da solução dispersora e extratora, força iônica, tempo de extração uso de agitação mecânica. Com a finalidade de aumentar a eficiência de extração e pré-concentração, esses parâmetros foram otimizados utilizando uma solução estoque de DMP, DEP, DEHP e DOP de 500 mg L⁻¹.

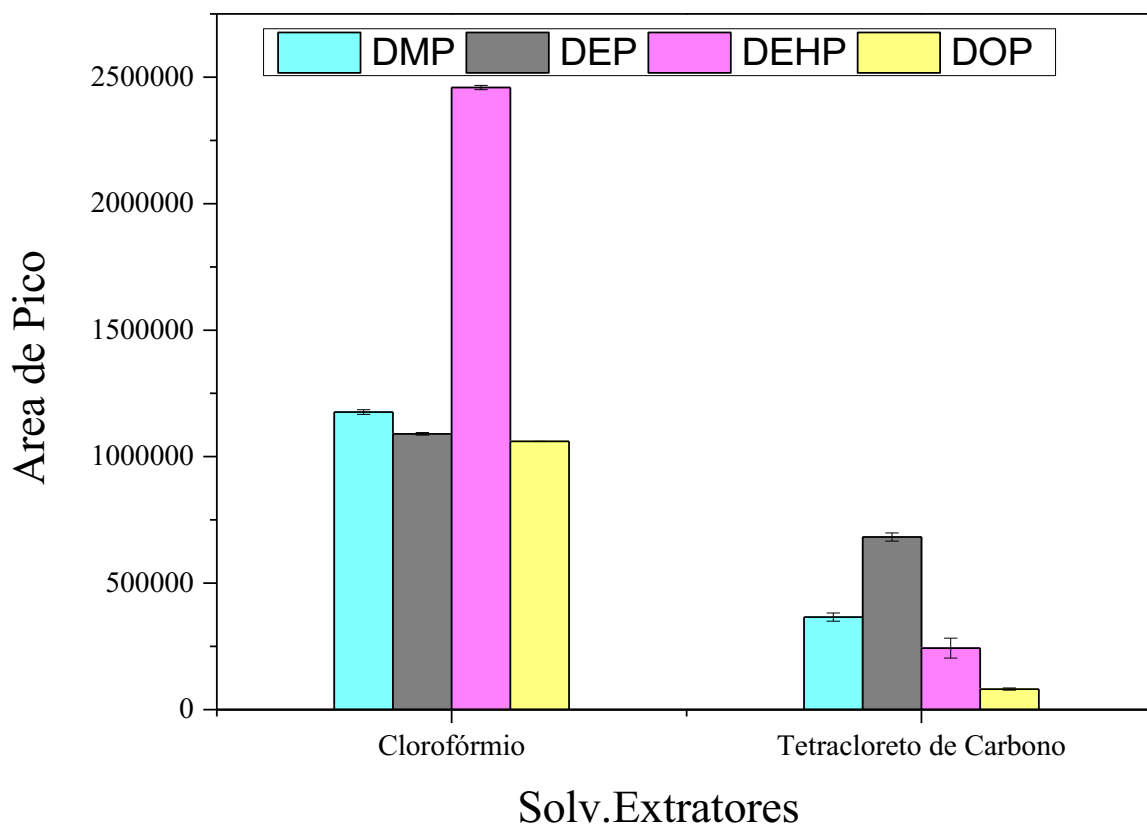
4.2.1- Estudo do Solvente Extrator

A escolha do melhor solvente extrator configura um dos principais parâmetros da DLMME, fatores como a densidade do solvente, a capacidade de extração do analito e a compatibilidade com a técnica analítica a ser utilizada, devem ser considerados para a escolha do solvente extrator Moreira, *et all.* (2012); Zang, *et all.* (2009). Os resultados obtidos foram a partir de uma alíquota de 5 mL de água deionizada com concentração de 0,5mg.L⁻¹, preparada a partir de uma solução estoque de 500 mg L⁻¹ da mistura dos quatro ftalatos, diretamente pipetada para tubos de vidro com fundo cônico, e com o auxílio de uma microseringa injetou-se rapidamente 200 µL dos solventes extratores a serem otimizados, clorotetradecano, hexanoato de metila, 2-Iodo tolueno, clorofórmio, tetracloreto de carbono, xileno, 1-dodecanol, juntamente com 800 µL de metanol mais 500 µL do solvente dispersor foram adicionados a fim de auxiliar na dispersão da microgotas, agitação manual, e injeção de 1 µL no GC-FID.

Os picos de retenção do xileno, 1-dodecanol, hexanoato de metila, ocorreram entre 6 e 10 min, sobrepondo os picos dos dois primeiros ftalatos DMP (6,7min) e DEP (8,4min), portanto o uso desses três solventes não viabilizaria a quantificação de todos os quatro ftalatos em estudo. O clorotetradecano e o 2-Iodo Tolueno apresentam formação não satisfatória da fase sedimentada, dificultando a coleta da fase para análise no GC. O clorofórmio e o tetracloreto de carbono apresentam volume de fase sedimentada satisfatória e tempos de

retenção seus solventes não sobrepujam nenhum ftalatos, foi então realizado em triplicada os estudos destes dois solventes pela técnica de DLMME, ilustrado na Figura 11.

Figura 10. Avaliação da eficiência dos solventes extratores na extração e pré-concentração por DLLME de DMP, DEP, DEHP e DOP com concentração de $0,5 \text{ mg. L}^{-1}$ em 5mL de água deionizada, (200 μL) solvente extrator e (800 μL metanol) do solvente dispersor.



Fonte: A autora.

De acordo com os resultados mostrados na Figura 10 o solvente extrator clorofórmio, apresentou melhores resultados de microextração dos que o solvente tetracloroeto de carbono. O fato de o clorofórmio ter obtido um melhor desempenho de extração, pode ser devido à sua maior solubilidade nos ftalatos conforme descrito na Figura 10, permitindo maior extração em relação aos outros solventes avaliados. Portanto, clorofórmio foi o solvente selecionado para as análises posteriores.

Tabela 4 Propriedades físico-químicas dos solventes extratores via DLLME

Solvente	Densidade (g/cm ³ , 20°C)	Solubilidade em água (g L ⁻¹ , 20°C)	Ponto de fusão (°C)	Ponto de ebulição (°C, 1013 hPa)	Pressão de Vapor (mmHg, 20°C)
EXTRATORES					
Clorofórmio (CHCl ₃)	1,47	8	-63	61	158
1,2-Dicloroetano (C ₂ H ₄ Cl ₂)	1,25	8,7	-35,5	83,5-84,1	65
Tetracloroeto de Carbono (CCl ₄)	1,59	0,8	-23	76,7	90

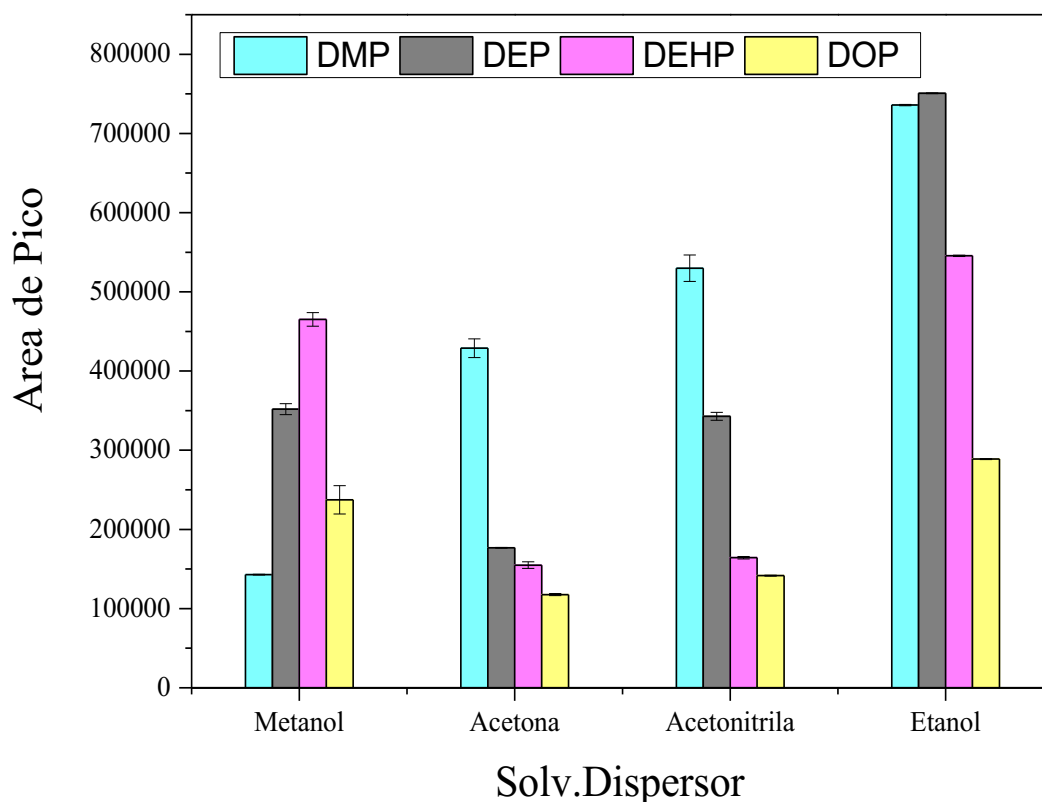
Fonte: Merck, 2013; CETESB, 2015.

4.2.2 Estudo do Solvente Dispersor

O solvente dispersor ideal em DLLME deve apresentar solubilidade adequada tanto na fase orgânica quanto na fase aquosa, para permitir a formação de microgotas e aumentar a recuperação da extração, e com o auxílio de uma microseringa injetou-se rapidamente 120µL de clorofórmio juntamente com os solventes dispersores a serem otimizados; metanol, etanol, acetona, acetonitrila, foram utilizados 500 µL dos solventes dispersores, utilizou-se agitação manual, e injeção de 1 µL no GC-FID.

Os resultados mostraram extração maior com etanol, o que sugere maior compatibilidade deste solvente com a fase aquosa e consequente maior formação de microgotas, aumentando a superfície de contato do solvente extrator com o analito. Os resultados podem ser melhor observados na Figura 11.

Figura 11. Avaliação da eficiência de diferentes solventes dispersores na extração e pré-concentração por DLLME de DMP, DEP, DEHP e DOP com concentração de 0,5 mg. L⁻¹ em (5mL de água deionizada).



Fonte: A autora.

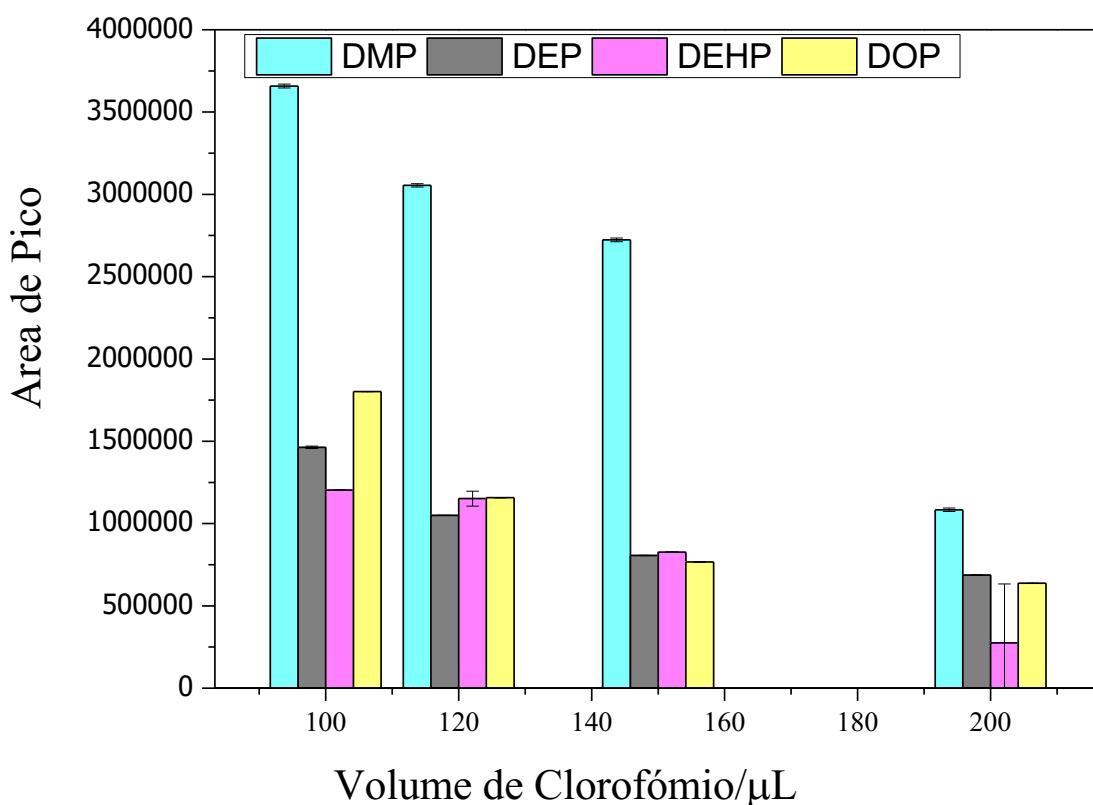
O estudo confirma um melhor desempenho de microextração com o solvente Etanol. Segundo SAX, N. IRVING (1975), o etanol não é considerado como sendo muito tóxico, de tal forma que em um ambiente apropriadamente ventilado, a probabilidade de intoxicação por inalação é baixa. O etanol não tem efeito cumulativo no corpo, já que é completamente oxidado a CO₂ e água em um breve intervalo de tempo. Diante dos expostos o solvente dispersor a ser utilizado será o etanol.

4.2.3 Estudo do Volume do Solvente Extrator

O volume de solvente extrator pode influenciar no volume de fase sedimentada, assim é de extrema importância a otimização do volume de solvente extrator a ser utilizado Rezaee, *et al.* (2009). Para avaliar o efeito do volume do solvente extrator na pré-concentração, foram

utilizadas soluções que continham diferentes volumes de clorofórmio como apresentado na Figura 14. Estes resultados foram obtidos a partir de uma alíquota de 5 mL de água deionizada com concentração de $0,5\text{mg.L}^{-1}$ da mistura dos quatro ftalatos, diretamente pipetada para tubos de vidro com fundo cônico, e com o auxílio de uma microseringa injetou-se rapidamente volumes diferentes de clorofórmio de 100-200 μL , juntamente com 800 μL do solvente dispersor seguido da adição de mais 500 μL dos solvente dispersor a fim de auxiliar na aglutinação da microgotas, agitação manual, e injeção de 1 μL no GC-FID.

Figura 12. Avaliação da eficiência dos volumes do solvente extrator clorofórmio, variando de 100 a 150 μL na extração e pré-concentração por DLLME de DMP, DEP, DEHP e DOP com concentração de $0,5\text{ mg.L}^{-1}$ em 5mL de água deionizada.



Fonte: A autora.

O volume de 100 μL de clorofórmio foi o que apresentou um melhor desempenho dentro das condições estudadas na aplicação da extração por DLMME, mas 100 μL não foi o

volume selecionado na otimização, pois no uso deste volume de clorofórmio, a formação da fase sedimentada foi dificultada devido ao pouco volume formado, havia a formação de bolhas na seringa as quais impossibilitavam a injeção, visto que a injeção no equipamento em que o trabalho foi realizado foi feita manualmente, e com volumes de 1 μ L, portanto foi inviável o uso do volume de 100 μ L. Foi selecionado para o decorrer dos próximos estudos o volume de 120 μ L, pois este foi o volume que apresentou o segundo maior desempenho de extração pela DLMME.

Conforme demonstra a Figura 14 a medida em que há um aumento do volume do solvente extrator, existe uma diminuição gradativo na área de pico até 200 μ L. Ao ser aumentado o volume do solvente extrator pode aumentar o fator de pré-concentração, até certo ponto, aumentando assim a eficiência da extração. Em contrapartida, quando o volume do extrator extrapola o ponto ótimo, o fator de pré-concentração é reduzido, consequentemente a eficiência também (DADFARNIA *et al.* 2013; MARTINS *et al.* 2012; NIAZI; KHORSHIDI; GHAEMMAGHAMI, 2015).

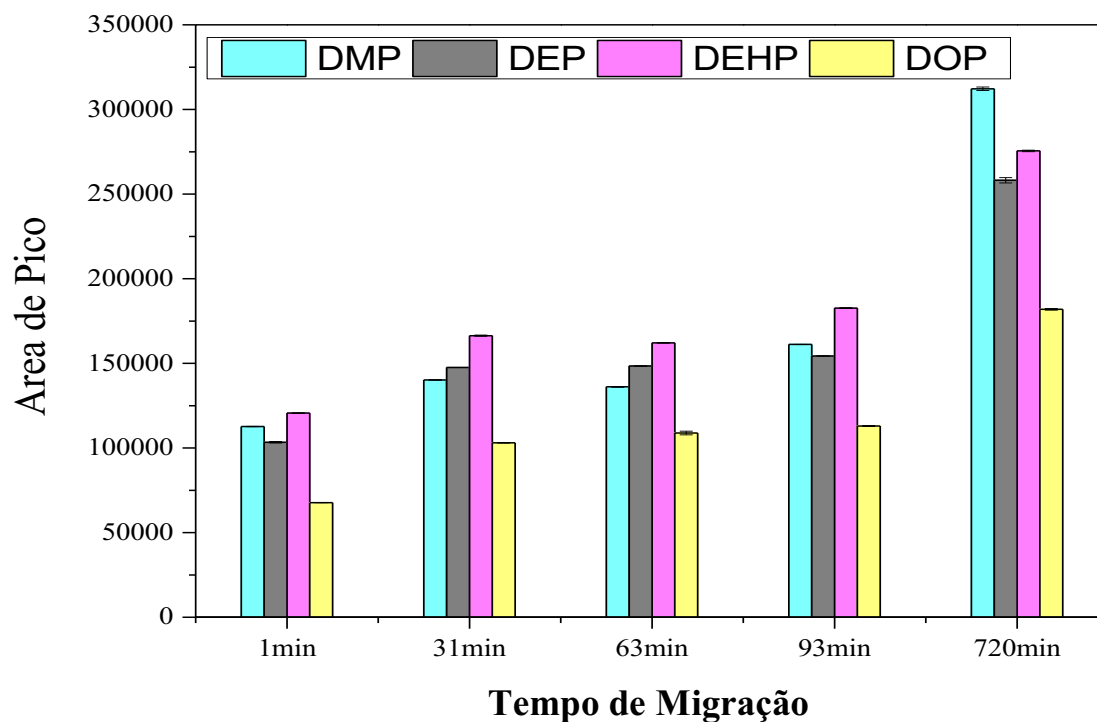
Os resultados permitiram identificar que a maior eficiência de extração e pré-concentração do DMP, DEP, DEHP e DOP foi alcançada a partir do volume de 120 μ L, assim este volume foi adotado nas determinações posteriores.

4.2.4 Estudo do tempo de Extração

Na técnica de DLLME, onde se utiliza um solvente dispersor solúvel na fase aquosa em conjunto com um solvente extrator insolúvel, durante a etapa de extração o solvente extrator é disperso na fase aquosa em gotas muito finas extraíndo os analitos.

Nesse momento, forma-se uma grande área superficial entre o solvente extrator e a amostra aquosa, o equilíbrio é atingido rapidamente, sendo essa a principal vantagem da técnica de DLLME (BORGES *et al.* 2015). Os resultados obtidos foram a partir de uma alíquota de 5 mL de água deionizada com concentração de 0,5mg.L⁻¹ da mistura dos quatro ftalatos, diretamente pipetada para tubos de vidro com fundo cônico, e com o auxílio de uma microseringa injetou-se rapidamente 120 μ L de Clorofórmio juntamente com 800 μ L de etanol, 500 μ L dos solventes dispersores foram adicionados a final de cada extração a fim de auxiliar na dispersão da microgotas, agitação manual, e o tempo de extração avaliados foram de 1 a 720 min seguidos de injeção de 1 μ L no GC-FID, os melhores tempos de extração estão descritos na Figura 13.

Figura 13. Avaliação da eficiência dos tempos de extração variando de 1 min até 720 min na extração e pré-concentração por DLLME de DMP, DEP, DEHP e DOP com concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ em 5mL de água deionizada.



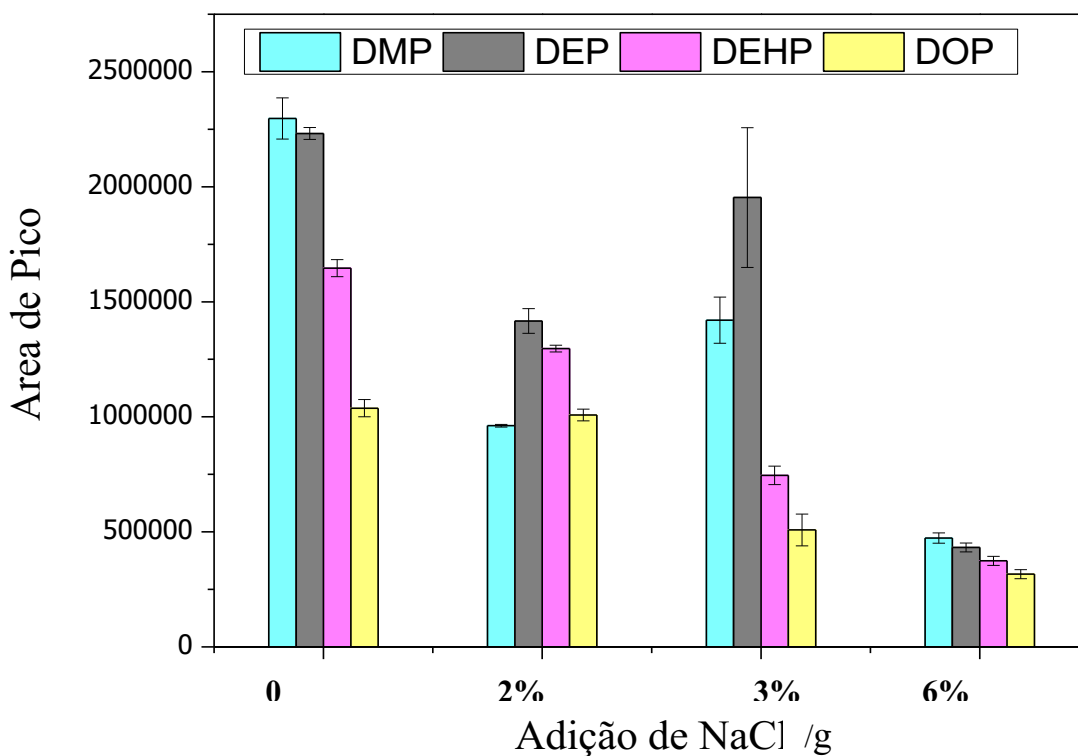
Fonte: A autora.

Conforme mostra a Figura 13 o tempo de extração de 720 min foi o que apresentou melhor eficiência de extração, porém é um tempo muito dispendioso de análise, tornando o procedimento moroso e inviável, entre os tempos de extração de 31 min e 93 min não se observa uma diferença tão significativa entre a eficiência de extração, o que apresenta menor desempenho é o tempo de 1 min, sendo este tempo de extração descartado. Como os tempos de 31 min até 93 não tem diferença significativa nos valores de extração por DLMME, o tempo escolhido para análises posteriores foi o de 31 min deixando a análise com um tempo de espera mais rápida, e com tempo de espera próximo ao tempo de corrida da amostra no GC.

4.2.5 Estudo do Adição de Sal

A força iônica pode interferir drasticamente na eficiência da DLLME, pois afeta a solubilidade do solvente extrator e assim o volume de fase sedimentada, e consequentemente a capacidade de extração e pré-concentração do analito (MARTINS, *et all.* 2012). A adição de sais acarreta na diminuição da solubilidade de compostos solúveis em água, facilitando a partição do analito no solvente orgânico, efeito conhecido como salting out (HEY, JACKSON, YAN, 2005). Avaliação do efeito da força iônica na extração e pré-concentração dos quatro ftalatos DMP, DEP, DEHP e DOP por DLLME em condições experimentais: foram adicionados 0,2 a 0,6 % (m/v) de NaCl em 5 mL de água deionizada com concentração de $0,5\text{mg.L}^{-1}$ da mistura dos quatro ftalatos, 920 μL de mistura extratora clorofórmio (120 μL) e metanol (800 μL) foram disperso com auxílio de uma seringa, os resultados obtidos estão descritos na Figura 16.

Figura 14. Avaliação da eficiência da força Iônica com adição de NaCl, na extração e pré-concentração por DLLME de DMP, DEP, DEHP e DOP com concentração de $0,5\text{ mg. L}^{-1}$ em 5mL de água deionizada.



Fonte: A autora.

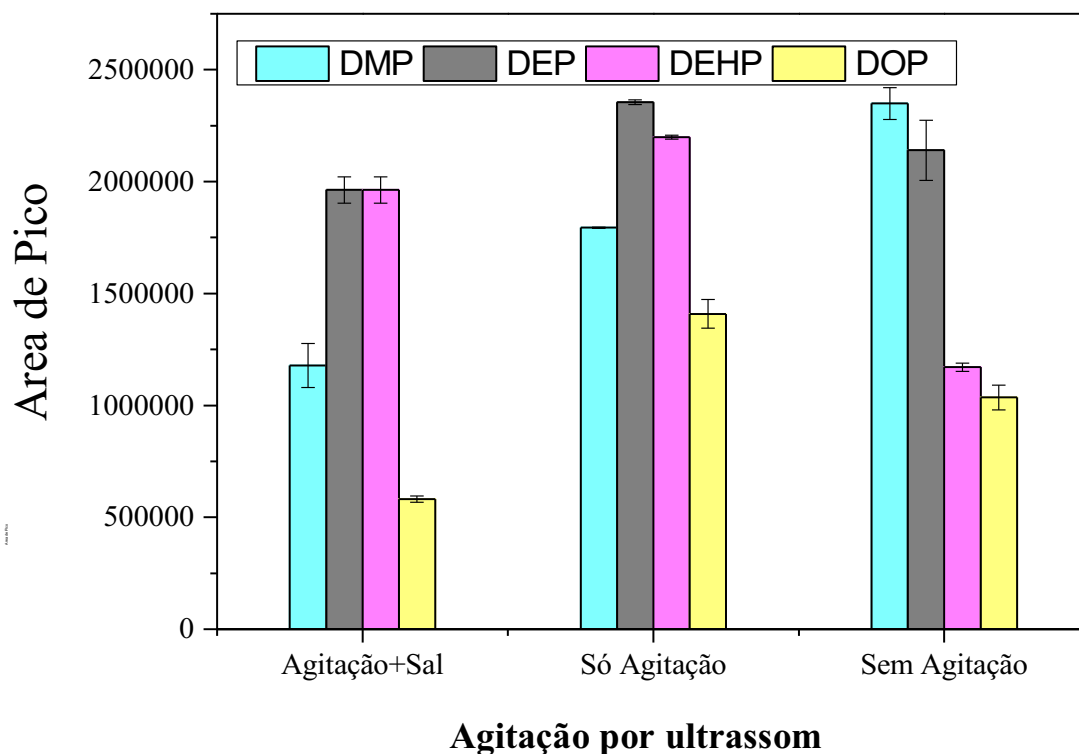
O efeito força iônica do meio na extração do DMP, DEP, DEHP e DOP por DLLME, foi avaliado e os resultados variaram significativamente, mas demonstraram uma eficiência maior de extração que não havia adição do NaCl, sendo esta condição selecionada para as determinações posteriores.

4.2.6 Estudo da Agitação

Segundo Chen et al. o uso de ultrassom facilita a extração e tem sido empregado para uma melhoria da técnica de extração por DLMME. Os estudos relataram que o uso do ultrassom aumentou a eficiência de extração, uma vez que microgotas menores são produzidas quando a vibração ultrassônica é empregada. A UA-DLLME (ultrasound-assisted-DLLME).

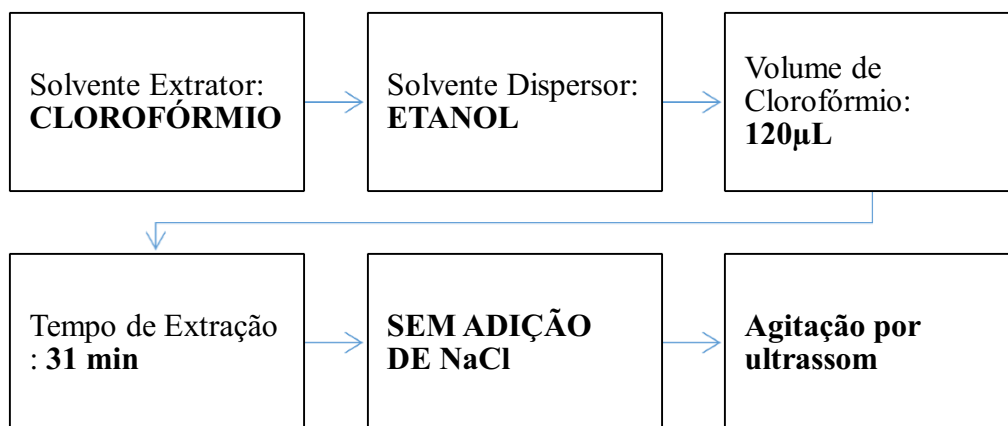
A fim de obter informação da melhoria do uso do ultrassom no procedimento de quantificação de ftalatos por DLMME em análise de GC-FID, foi realizado o teste de agitação mecânica, utilizando o ultrassom. Uma alíquota de 5 mL de água deionizada foi diretamente pipetada para tubos de vidro com fundo cônico, e com o auxílio de uma microseringa injetou-se rapidamente 920 µL da mistura de extrator/dispersor em banho de ultrassom por 3 min adicionou-se mais 500 µL de Etanol após o uso do ultrassom, a fim de auxiliar na dispersão da microgotas. As gotículas do solvente extratoras depositados no fundo do tubo contendo o DMP, DEP, DEHP e DOP, foram retiradas com o auxílio de uma microseringa. Depois foram injetadas 1 µL no GC-FID.

Figura 15. Avaliação da eficiência de agitação por ultrassom com e sem adição de NaCl usando o ultrassom na extração e pré-concentração por DLLME de DMP, DEP, DEHP e DOP com concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ em 5mL de água deionizada.



Fonte: A autora.

Após as etapas de otimização, as condições ótimas para extração e pré-concentração dos quatro ftalatos DMP, DEP, DEHP e DOP em amostras de água por DLLME foram: sem adição de NaCl, com adição de $920 \mu\text{L}$ de solução extratora (contendo $120 \mu\text{L}$ de clorofórmio e $800 \mu\text{L}$ de etanol) por 31 minutos de espera da separação da fase sedimentada para determinação por GC-FID.

Tabela 5 Parâmetros das melhores condições obtidas via DLLME

Fonte :A autora

4.3- Característica Analíticas

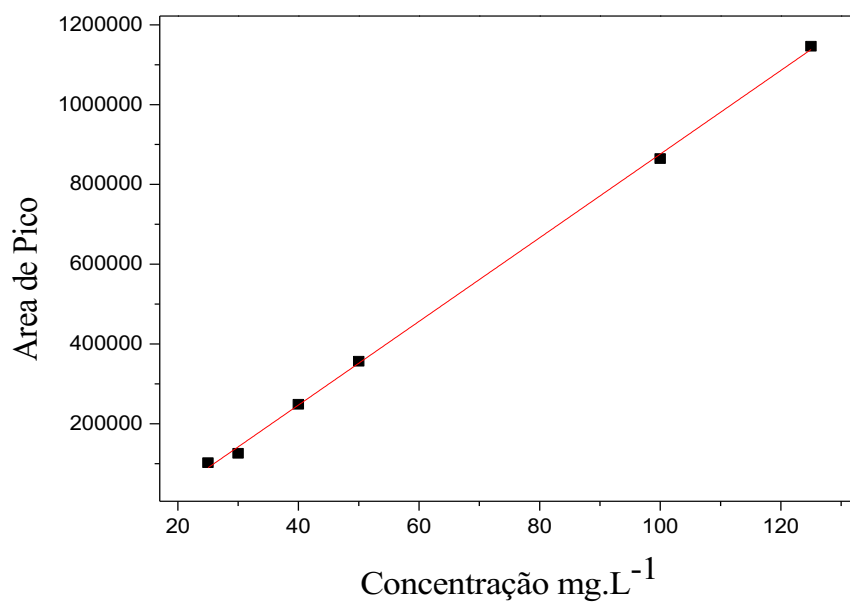
4.3.1- Linearidade

A linearidade é definida como a capacidade do método analítico em fornecer resultados proporcionais à concentração do analito presente na amostra, dentro de uma faixa de concentração, na qual se pode correlacionar o valor de uma variável dependente (medida) por meio de uma variável independente (concentração) Chasin *et all.* (1998); Inmetro,(2003).

Reunidas as condições experimentais para o procedimento da extração por DLMME dos quatros ftalatos DMP, DEP, DEHP e DOP procedeu-se ao tratamento quantitativo desta, através da construção das curvas de calibração com e sem pré-concentração.

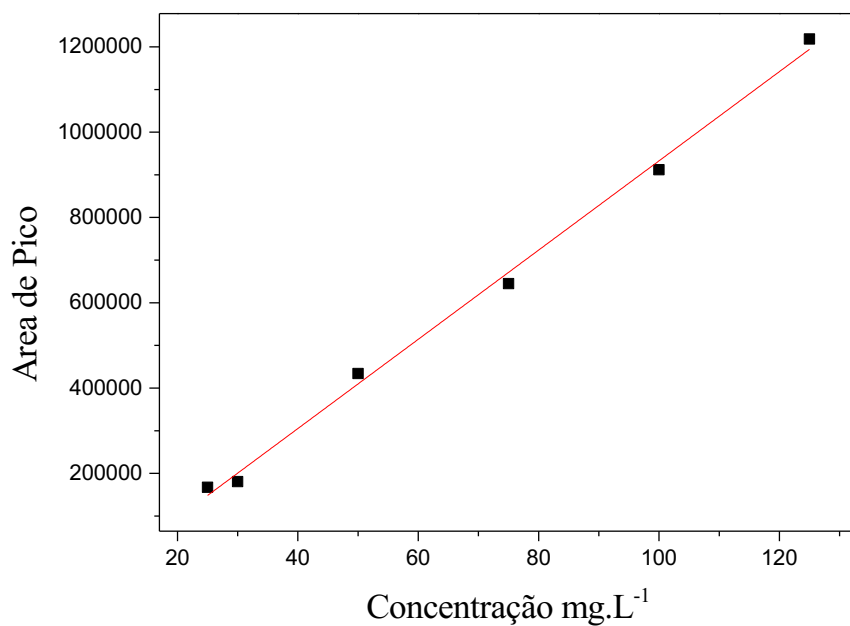
As curvas de calibração sem pré-concentração foram obtidas a partir de análises de soluções concentrações de 0,5 até 125mg.L⁻¹ em ACN. A relação entre as concentrações iniciais foram feitas considerando os limites de detecção de cada um dos ftalatos em estudo, as concentrações finais foram iguais a todos os quatro ftalatos (até 125mg.L⁻¹), as soluções do DMP e DEP iniciou-se na concentração de 25mg.L⁻¹ , DEHP iniciou-se com concentração de 0,5mg.L⁻¹, e do DOP iniciou-se em 5mg.L⁻¹ . Com base na detecção do GC-FID, foram obtidos valores de áreas para todas as concentrações, foi construído uma curva a partir destes valores de área.

Figura 16. Curva analítica de calibração do DMP sem pré-concentração obtidas a partir de concentrações de 25 até 125mg.L⁻¹ em ACN.



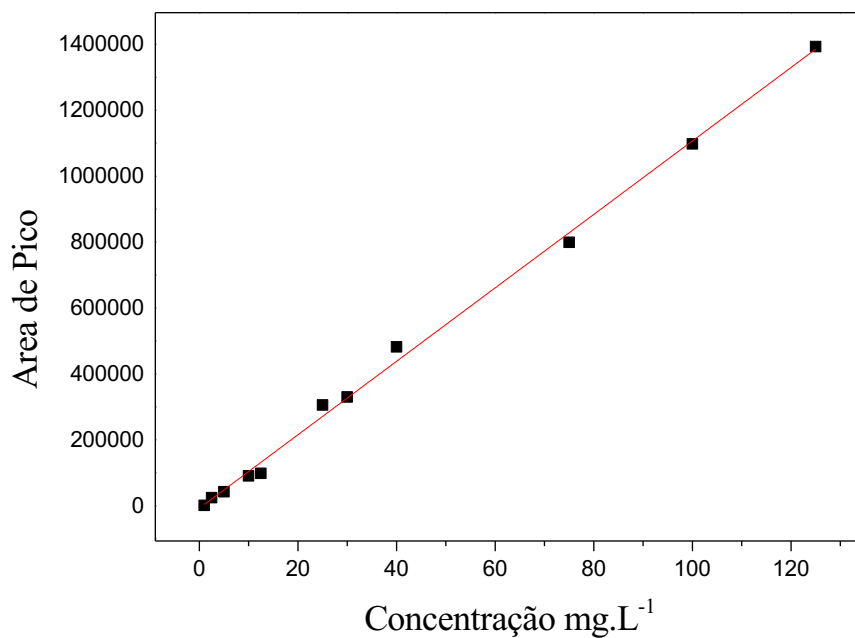
Fonte: A autora.

Figura 17. Curva analítica de calibração do DEP sem pré-concentração obtidas a partir de concentrações de 25 até 125mg.L⁻¹ em ACN.



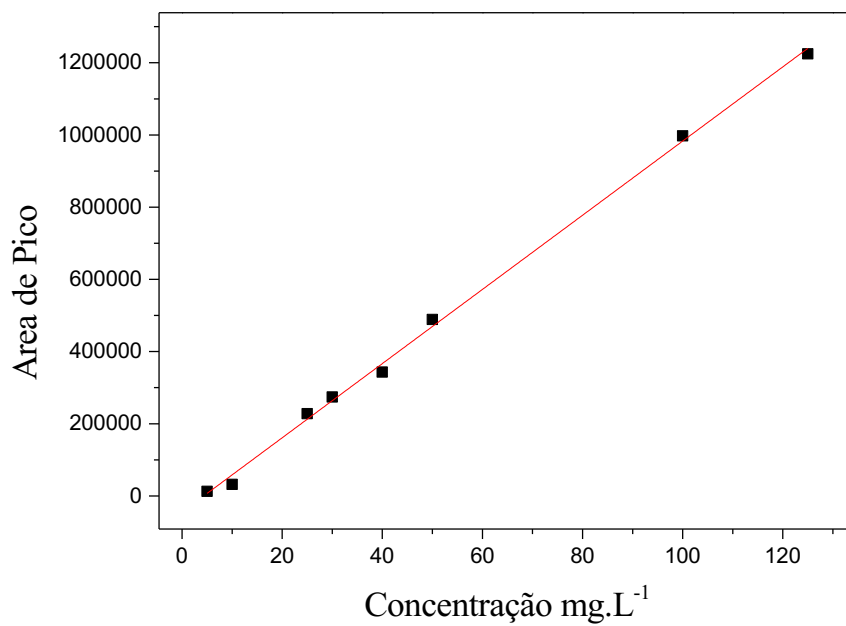
Fonte: A autora.

Figura 18. Curva analítica de calibração do DEHP sem pré-concentração obtidas a partir de concentrações de 0,5 até 125mg.L⁻¹ em ACN.



Fonte: A autora.

Figura 19. Curva analítica de calibração do DEHP sem pré-concentração obtidas a partir de concentrações de 0,5 até 125mg.L⁻¹ em ACN.

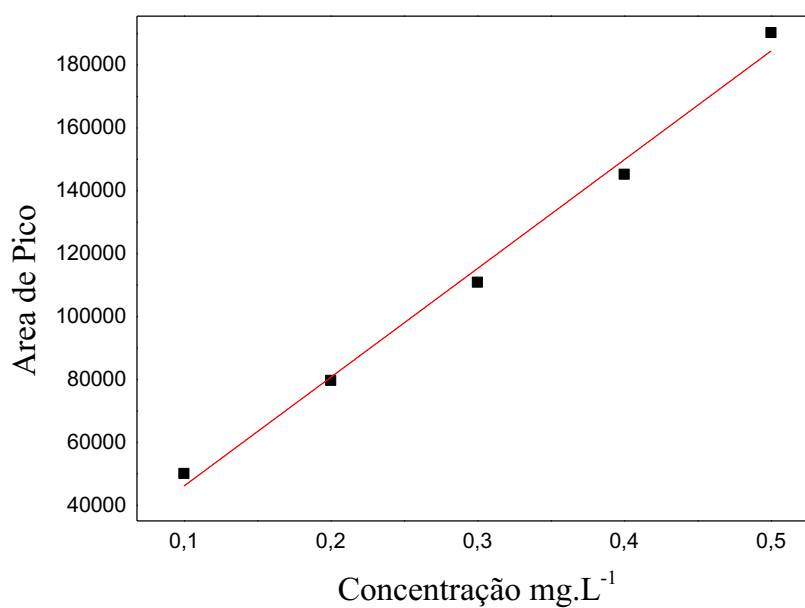


Fonte: A autora.

Os resultados obtidos evidenciam curva de calibração satisfatória no intervalo de concentrações de DMP, DEP, DEHP e DOP selecionado, uma vez que se obteve coeficiente de $(R^2) > 0,99$.

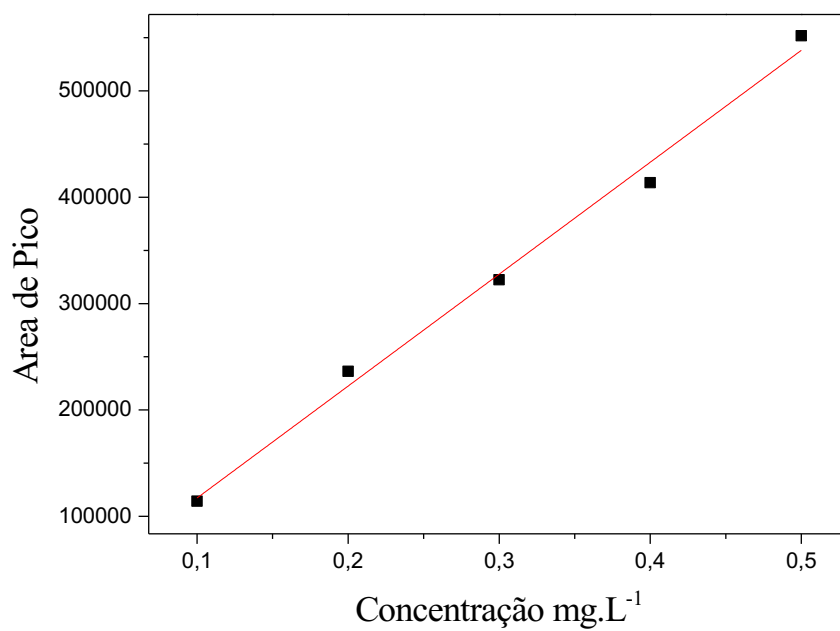
As curvas de calibração com pré-concentração foram obtidas a partir de concentrações diferentes de 0,1 até 0,5 mg. L⁻¹, para DMP, DEP, DEHP e DOP. Uma alíquota de 5 mL de água deionizada, foi diretamente pipetada para tubos de vidro com fundo cônico, e com o auxílio de uma microsseringa injetou-se rapidamente 120µL de clorofórmio juntamente com 800µL do etanol, após 33 min, retirou-se 1 µL da fase sedimentada e foi feita a injeção no CG-FID. Com base na detecção do GC-FID, foram obtidos valores de áreas para todas as concentrações de todos os quatro ftalatos, fora construído uma curva de calibração analítica da pré concentração para cada um dos ftalatos a partir de seus respectivos valores de área.

Figura 20. Curva analítica de calibração da pré-concentração do DMP, obtida por DLMME nas faixas de concentrações de 0,1 até 0,5mg.L⁻¹.



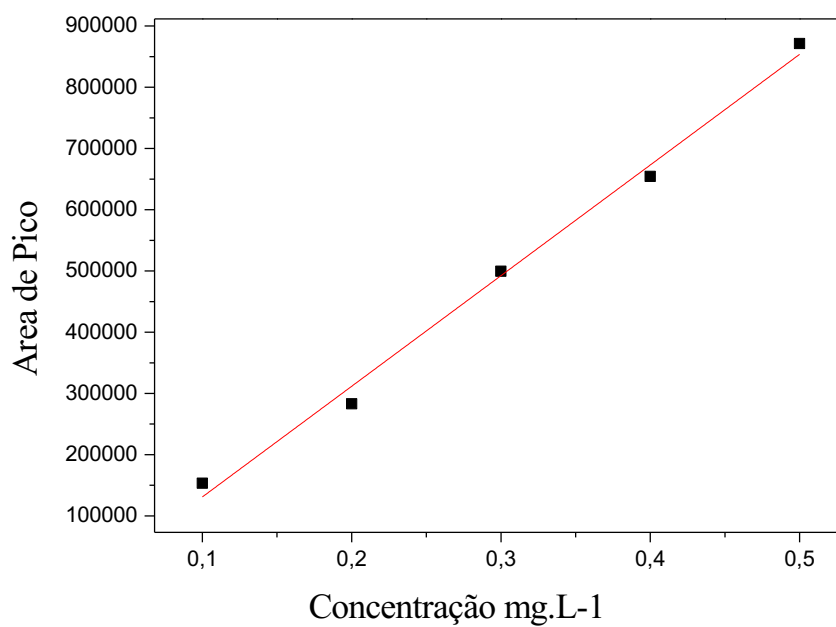
Fonte: A autora.

Figura 21. Curva analítica de calibração da pré-concentração do DEP, obtida por DLMME nas faixas de concentrações de 0,1 até 0,5mg.L⁻¹.



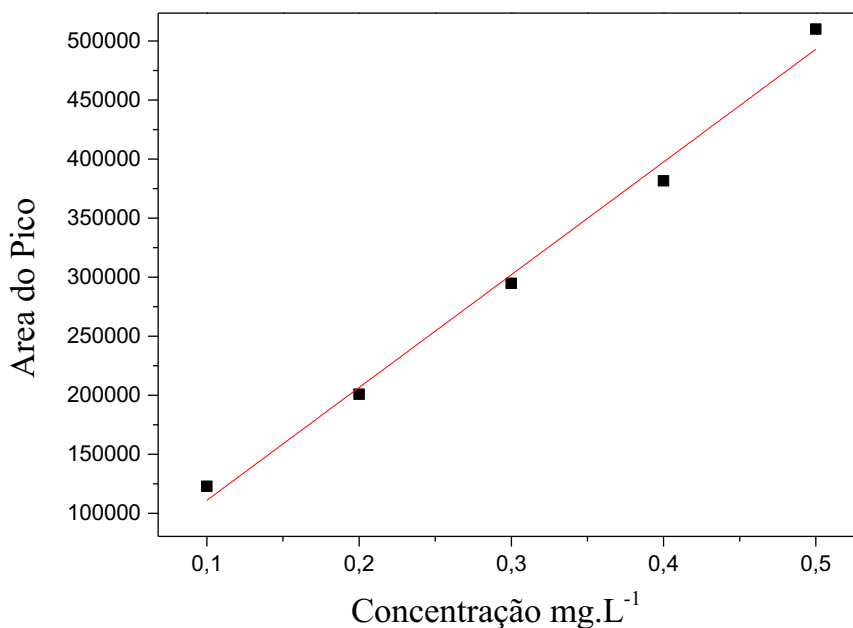
Fonte: A autora.

Figura 22. Curva analítica de calibração da pré-concentração do DEHP, obtida por DLMME nas faixas de concentrações de 0,1 até 0,5 mg L⁻¹.



Fonte: A autora.

Figura 23. Curva analítica de calibração da pré-concentração do DOP, obtida por DLMME nas faixas de concentrações de 0,1 até 0,5 mg.L⁻¹.



Fonte: A autora.

As equações de reta das curvas de calibração com pré-concentração e sem pré-concentração e os coeficientes de determinação para o ajuste linear das curvas de calibração são apresentadas nas Tabela 6 e 7.

Tabela 6 Parâmetros de calibração das curvas obtidas sem pré-concentração.

Ftalatos	Correlação Linear (R^2)	Person's r	Equação da Reta
			$y = a + bx$
DMP	0,99912	0,99965	$y = 10485,1x - 172456,8$
DEP	0,99558	0,99823	$y = 10460,7x - 113310,9$
DEHP	0,99732	0,99878	$y = 11148,0x - 6764,7$
DOP	0,99791	0,99911	$y = 10275,2x - 44373,3$

Fonte: A autora.

Tabela 7 Parâmetros de calibração das curvas obtidas com pré-concentração.

Ftalatos	Correlação Linear (R^2)	Person's r	Equação da Reta $y = a + bx$
DMP	0,99933	0,99792	$y = 325935x + 15511,5$
DEP	0,99821	0,99446	$y = 1,06218E6x + 11032,2$
DEHP	0,99446	0,99802	$y = 1,79008E6x - 41300,6$
DOP	0,99172	0,99689	$y = 961969x + 14833,9$

Fonte: A autora.

Os resultados obtidos evidenciam curva de calibração satisfatória no intervalo de concentrações definidas para os quatros ftalatos em estudo, DMP, DEP DEHP e DOP, nas curvas de calibrações com e sem pré-concentração, selecionadas, uma vez que se obteve coeficiente de determinação (R^2) > 0,99 em todos as curvas.

4.3.2- Ensaios de Recuperação (R)

A recuperação (ou fator de recuperação), R, é definida como o percentual da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada Thompson *et all.* (1999).

Na Tabela 8 estão apresentados os valores das médias dos percentuais de recuperação dos ftalatos DMP, DEP, DEHP e DOP, avaliados quatro amostras de água para uso em hemodiálise, fortificados com 0,2 mg L⁻¹ de concentração, utilizando o método DLLME otimizado. A recuperação foi calculada utilizando a curva analítica da pré-concentração, aceitando o critério de recuperação entre 70 e 120%, conforme a recomendação de validação de métodos cromatográficos Ribani *et all.* (2004) ; SANCO, (2013).

As amostras descritas na Tabela 8, referem-se a pontos de coletas diferentes das etapas de tratamento da água de hemodiálise e em dias diferentes, as amostras estão descritas como; Amostra I -Pré-Pré tratamento; Amostra II- Pós- Pré tratamento; Amostra III- Tratada; Amostra IV- Armazenada dia (29/08/2019) ; Amostra V- Armazenada dia (26/09/2019).

Tabela 8 Estudo da Recuperação (R) em (%) de DMP, DEP DEHP e DOP onde as amostras de água de hemodiálise fortificadas com ftalatos 0, 2mg.L-1 em ACN

AMOSTRAS	DMP	DEP	DEHP	DOP
I	103,4	76,3	91,1	104,6
II	112,1	79,1	91,6	104,5
III	110,3	80,3	93,5	105,3
IV	115,4	84,46	116,5	121,5
V	113,9	79,8	97,8	103

Fonte: A autora.

O método proposto apresentou boa recuperação, com valor de recuperação média de 112 % para o DMP, 82 % para o DEP, 100 % para o DEHP, 110 % para o DOP, conforme pode ser observado na tabela 5 Tais resultados confirmam que uma das vantagens da técnica de DLLME, são altos valores de recuperação, Moreira *et all.* (2014). Portanto os valores obtidos nos teste de recuperação entre (80% a 110%) mostraram boa exatidão do método proposto.

4.3.3- Fator de Enriquecimento (FE) e Fator de Pré concentração (FC), Coeficiente de Variação (CV)

O fator de enriquecimento (FE) é uma das formas empregadas para analisar a eficiência dos sistemas de pré-concentração, pode ser obtido através da razão dos coeficientes angulares com e sem a pré-concentração. Para fazer essa comparação, foi construída uma curva analítica passando pelo procedimento otimizado da DLMME, curva da pré-concentração (com cinco pontos para DMP, DEP, DEHP e DOP, cada um medido em

triplicata) e uma curva analítica sem pré concentração (cada ponto em triplicata). Os resultados obtidos por essas curvas estão apresentados na Tabela 6.

O fator de ré concentração foi obtido através do procedimento em que uma alíquota de 5 mL de água deionizada com uma concentração final de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, foi diretamente pipetada para tubos de vidro com fundo cônico, e com o auxílio de uma microseringa injetou-se rapidamente $120 \mu\text{L}$ de clorofórmio juntamente com $800 \mu\text{L}$ do etanol, após 33 min, adicionou-se mais $500 \mu\text{L}$ de etanol a fim de auxiliar na dispersão da microgotas, agitou-se manualmente, retirou-se $1 \mu\text{L}$ da fase sedimentada e foi feita a injeção em triplicata no CG-FID. Com base na detecção do GC-FID, foram obtidos valores de áreas para todas as concentrações de todos os quatro ftalatos DMP, DEP, DEHP e DOP, através das médias das áreas obtidas foi realizado o cálculo da (FC) por meio de uma curva de calibração analítica sem pré-concentração. A relação entre a concentração encontrada após os cálculos (Concentração Final / Concentração Inicial), nos permite conhecer os valores de (FC), mostrados na Tabela 9.

Para conhecer o Coeficiente de Variação (CV) realizou-se 10 injeção da mistura dos quatros ftalatos nas condições otimizadas por DLMME, para cada um dos ftalatos obteve-se valores de áreas, calculou-se as médias e os desvio padrão de todas as medidas, através da Eq. (1) obteve-se os valores de (CV).

Tabela 9 Parâmetros obtidos pelo método desenvolvido para o Fator de enriquecimento (FE) , Fator de pré concentração (FC), e coeficiente de variação (CV).

Ftalatos	(FE)	(FC)	CV (%)
DMP	31,1	373,8	0,71
DEP	101,6	532,2	0,47
DEHP	161	395,2	0,75
DOP	94	276,3	0,85

Fonte: A autora.

O FE indicou a boa capacidade de pré-concentração do analito, sendo o valor obtido para FE com o método. Este valor de FE é bastante satisfatório tratando-se da concentração de

DMP, DEP, DEHP e DOP em águas de hemodiálise. Os valores de (FC) mostraram satisfatórios para o procedimento otimizado por DLMME, para a quantificação dos ftalatos em estudo nas amostras de água de hemodiálise.

Os valores de CV encontrados variaram entre 0,4 % até 0,7 %, mostram que os CVs obtidos estão todos abaixo de 1%, o que indica uma precisão adequada do método proposto, já que o critério de precisão da Eurachem exige CVs abaixo de 20% que é descrito como ideal pelos guias de validação. É possível observar que para todos os analitos foram obtidos valores de recuperação satisfatórios, uma vez que se trata de extração simultânea de quatro ftalatos com características distintas.

4.3.4- Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O LD experimental foi considerado como sendo a menor concentração dos analitos, detectável pelo procedimento. O experimento foi realizado a partir de diluições sucessivas até quando a relação sinal ruído for menor que três, das soluções de padrões contendo DMP, DEP, DEHP e DOP, de $125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ até as concentrações de $0,50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. O método otimizado por DLMME, apresentou limites de detecção para cada um dos ftalatos estudados, e os LQ experimental foi obtido 3 vezes maior do que o LD, os valores encontrados de quantificação e detecção estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 Parâmetros obtidos pelo método desenvolvido para o Limite de Detecção (LD) e quantificação (LQ) dos ftalatos na concentração de 0,5 até $125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ em ACN.

Ftalatos	LD ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	LQ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
DMP	0,066	0,198
DEP	0,046	0,138
DEHP	0,00036	0,0106
DOP	0,012	0,036

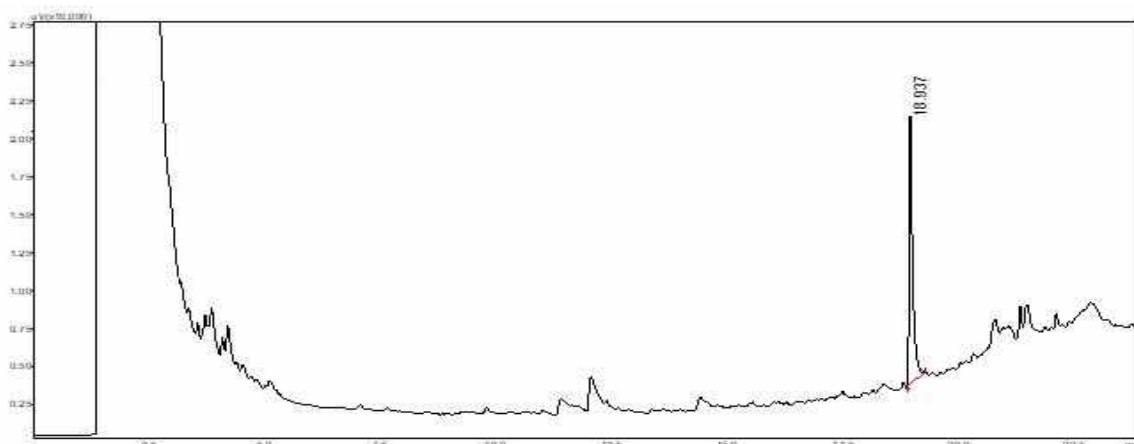
Fonte: A autora.

O método desenvolvido e validado apresentou bons resultados de linearidade, precisão e recuperação. Também possui valores baixos de LQ, indicando boa detectabilidade e adequação para determinação dos analitos em estudos DMP, DEP, DEHP e DOP, pela técnica da DLLME.

4.4- Aplicação em amostras de água de Hemodiálise

As amostras foram coletadas no setor de hemodiálise do Hospital de Clínicas de Uberlândia (HCU/UFU). As coletas foram feitas em dias diferentes, e no decorrer das etapas do tratamento da água de hemodiálise. Pegou-se uma alíquota de 5 mL de água de hemodiálise, Amostras I, II, III, IV e V. Com base nos cromatogramas obtidos foi verificado um pico no tempo de retenção correspondente ao pico do ftalato DEHP, em todas as amostras analisadas. O cromatograma da Figura 24 corresponde a Amostra IV, que apresentou maior valor de concentração conforme mostrado na Tabela 8, todavia em todas as amostras verificou-se a presença do DEHP.

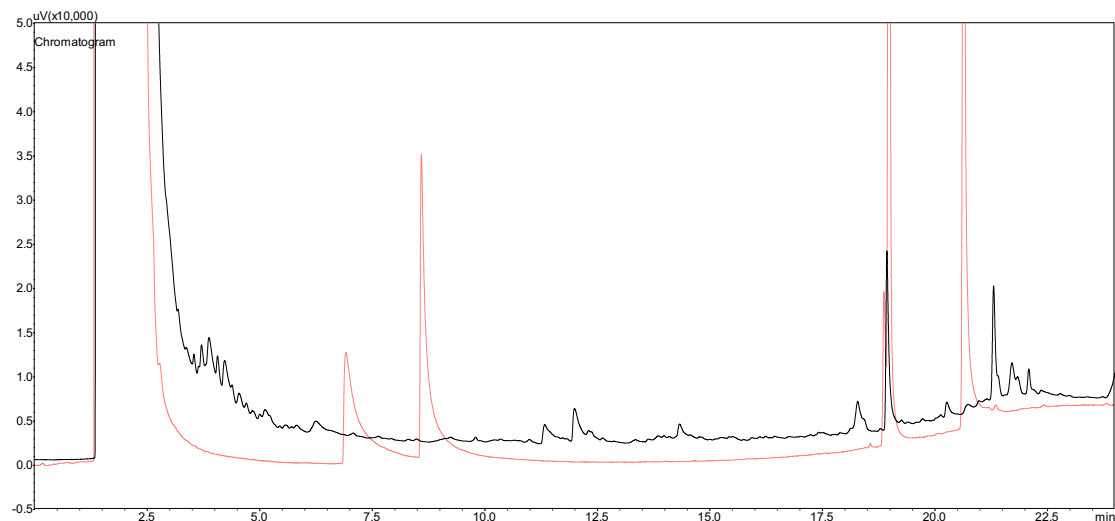
Figura 24. Cromatograma obtido por GC-FID da mistura dos ftalatos DMP, DEP, DEHP e DOP, para a amostra de água de hemodiálise, amostra IV, demonstrando presença de um dos ftalatos o DEHP contemplados no procedimento da DLLME otimizado.



Fonte: A autora.

NOTA: As condições de análise foram 5mL das amostras coletadas, 1020 µl da mistura dos solventes dispersor e extrator, 33 min de corrida, agitação com ultrassom.

Figura 25. Cromatogramas da mistura do padrão dos quatro ftalatos (cor rosa) e da extração do DEHP em amostra de água de hemodiálise (cor preta), aplicado na DLMME otimizada.



Fonte: A autora.

As sobreposições dos cromatogramas da mistura dos quatro ftalatos mostrado na Figura 25 na (cor vermelha) confirma o pico de retenção do DEHP na (cor preta), e após fortificação das amostras visto no estudo de recuperação os valores de área d DEHP foram aumentados em todas as amostras.

Tabela 11 Quantificação de DEHP em função dos pontos de coletas e dias de coleta em amostras de água de hemodiálise.

AMOSTRAS	Ponto da Coleta da amostra	Valores em concentração (mg. L ⁻¹) de DEHP
I	Pré-pré tratamento	0,1822
II	Pós- Pré tratamento	0,1833
III	Tratada	0,1868
IV	Armazenada	0,2330
V	Armazenada	0,1968

Fonte: A autora.

Na Tabela 11 observamos que em todas as amostras foram encontrados concentrações significativas do DEHP, nas etapas anteriores a armazenagem amostras I,II,III foram obtidos menores valores de concentração, porém na Amostras IV, V o valor foi maior, isso pode ter ocorrido devido ao local de armazenagem ser um reservatório em PVC e ter maior tempo de contato com a água de hemodiálise. Como o DEHP não é quimicamente ligado ao plástico, ele é uma fonte de riscos e de perigos de contaminação pela simples difusão para os meios ou fluidos em contato. Reconhecendo a toxicidade do DEHP, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (“Environmental Protection Agency” / USA - EPA) fixou a concentração do mesmo em 6 µg/L para águas acondicionadas em garrafas plásticas e o uso de plastificantes tóxicos foi proibido em brinquedos que vão a boca de crianças Chen *et all.* (2004). O conteúdo de DEHP nestes produtos varia de 20 a 40%, podendo atingir mais de 50% (EPA, 1996; WHO, 1992).

No Brasil ainda não tem uma legislação específica quanto ao uso os limites de exposição aos ftalatos, se levarmos em consideração aos valores determinados pela EPA, os valores de concentrações encontrados nas amostras de água de hemodiálise estão superiores.

Os resultados obtidos confirmaram a presença do DEHP realizadas por CG-FID para as amostras analisadas. Não foi confirmada a presença dos outros três ftalatos DMP, DEP E DOP nas amostras.

4.5- Perspectivas Futuras

- Pretende-se aplicar o procedimento otimizado da DLLME em outras amostras, tais como o soro de hidratação venosa de locais diferentes, amostras de água mineral e com gás.
- Almeja-se o monitoramento das amostras de água de Hemodiálise durante um período maior de tempo (3 meses), com uma coleta semanal das amostras nos pontos de coletas relacionados as etapas de tratamento da água de Hemodiálise.

5- CONCLUSÃO

O procedimento proposto para determinação e quantificação de DMP, DEP, DEHP e DOP em amostras de água de hemodiálise, após procedimento de extração e pré-concentração por DLLME mostrou ser rápida e eficiente, além de apresentar uma boa detectabilidade. Outros parâmetros otimizados foram, a força iônica do meio com melhor resultado de extração sem adição de NaCl, a agitação mecânica com uso de Ultrassom apresentou diferenças pouco significativas na extração, o procedimento não possui etapa de centrifugação. Os parâmetros de méritos obtidos foram otimizados e apresentam valores satisfatórios, os fatores de enriquecimento e teste de recuperação e pré concentração foram respectivamente de 32– 161, 80 – 122% e 374 –533 respectivamente. O procedimento desenvolvido apresentou bons resultados de linearidade, precisão e recuperação. Também possui valores baixos de LQ, indicando boa detectabilidade e adequação para determinação dos analitos em estudos.

Aplicação nas amostras de águas de hemodiálise foram satisfatórias, foram encontrados em todas as amostras estudadas o ftalato DEHP, em concentrações variando de 0,18 a 0,23 mg. L⁻¹, os outros três ftalatos não foram identificados nas amostras. É possível concluir que, o procedimento proposto se mostrou eficiente na extração e pré-concentração dos ftalatos DMP, DEP, DEHP e DOP, pela técnica otimizada da DLMME, por detecção no CG-FID.

REFERÊNCIAS

- ALSHANA, U. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop combined with counter-electroosmotic flow normal stacking mode in capillary electrophoresis for the determination of bisphenol a in water and urine samples. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, v. 36, n. 20, p. 2855-2870, 2013.
<https://doi.org/10.1080/10826076.2012.725700>
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA. Resolução n. 105/99. Dispões sobre os aditivos para materiais plásticos destinados à elaboração de embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos, 1999.
- ARTHUR, C.L., PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, vol. 62, n. 19, pp. 2145-2148, 1990.
<https://doi.org/10.1021/ac00218a019>
- ARJOMANDI-BEHZAD, L.; YAMINI, Y.; REZAZADEH, M. Extraction of pyridine derivatives from human urine using electromembrane extraction coupled to dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography determination. *Talanta*, v. 126, p. 73-81, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.02.066>
- ASTM F963-96. Standard consumer safety specification on toy safety. American Society for Testing and Materials. 1986.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological Profile for Di-n-Butyl Phthalate. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA, 2001. Disponível em <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp135.pdf> Acesso em 12 de out. 2019.
- BAGÓ, B. et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate in sewage sludge and post-treated sludge: quantitative determination by HRGC-MS and mass spectral characterization. *Chemosphere*, v. 59, n. 8, p. 1191-1195, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.077>
- BELL, F.P. Effects of phthalate esters on lipid metabolism in various tissues, cells and organelles in mammals. *Environmental Health Perspectives*, v. 45, p. 41-50, 1982.
<https://doi.org/10.1289/ehp.824541>
- BENJAMIN, S., PRADEEP, S.; JOSH, M.S., KUMAR, S.; MASAI, E. A monograph on the remediation of hazardous phthalates. *Journal of Hazardous Materials*; v. 298, p. 58-72, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.05.004>

BIRKETT, J. W; LESTER, J. N. Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes. Boca Raton, Florida, USA: IWA Publishing and Lewis Publishers, 2003.

<https://doi.org/10.1201/9781420032185>

BORGES, Keyller Bastos; FIGUEIREDO, Eduardo Costa de; QUEIROZ, Maria Eugênia Costa. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. Grupo Editorial Nacional GEN. 2015.

BOSCH OJEDA, C.; SÁNCHEZ ROJAS, F. Separation and preconcentration by dispersive liquid-liquid microextraction procedure: A review. *Chromatographia*, v. 69, n. 11-12, p. 1149-1159, 2009.

<https://doi.org/10.1365/s10337-009-1104-1>

BRASIL. Resolução nº 91 /2001: critérios gerais e classificação de materiais para embalagens e equipamentos em contato com alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, 3 jun. 2001. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/91-_01rdc.htm Acesso 06 out. de 2019.

BREAST CANCER & THE ENVIRONMENT RESEARCH CENTERS (BCERD). Fact Sheets on PHTHALATES: Early life exposure and breast cancer risk in later years. San Francisco, 2007. p. 21 - 30.

BRITO, N.M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v.13, p.130-146, 2003.

<https://doi.org/10.5380/pes.v13i0.3173>

BROWN, D.; THOMPSON, R.S; STEWART, K.M.; CROUDACE, C.P.; EDWARD, G. The effect of phthalate ester plasticisers on the emergence of the midge (*Chironomus riparius*) from treated sediments. *Chemosphere*, v.32, p. 2177-2187, 1996.

[https://doi.org/10.1016/0045-6535\(96\)00128-2](https://doi.org/10.1016/0045-6535(96)00128-2)

BUGNO, A. et.,al; Detecção de bactérias Gram-negativas não fermentadoras em água tratada para diálise. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 66, n. 2, p. 172-175, 2007.

CALDAS, S. S.; ZANELLA, R.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, G. E.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova*, vol. 34, pg. 1604 - 1617, 2011.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000900021>

CARASEK, E.; MERIB, J. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 880, p. 8-25, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.049>

CHASIN, A.M.; NASCIMENTO, E. S.; NETO, L. M. R.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADOR, M. C.; FERNÍCOLA, N. A.G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. *Rev. Bras. Toxicol.*, v.11, n.1, p.1-6, 1998.

CHEN, C.Y. et al. Rapid identification of phthalates in blood bags and food packaging using ToF-SIMS. *Applied Surface Science*. v. 231/232, p. 447-451, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2004.03.168>

COLLINS, C.H. *Princípios básicos de cromatografia*. 3. ed. Campinas: Unicamp, 1988. 236 p.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Unicamp, 2006. 453 p.

CRUZ-VERA, M. et al. One-step in-syringe ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, n. 37, p. 6459-6465, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.07.040>

DADFARNIA, S. et al. Combination of solid phase extraction and dispersive liquid-liquid microextraction for separation/preconcentration of ultra trace amounts of uranium prior to its fiber optic-linear array spectrophotometry determination. *Journal of Hazardous Materials*, v. 263, p. 670- 676, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.028>

DE OLIVEIRA, A. R. M. et al. Microextração em fase líquida (LPME): Fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. *Química Nova*, v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000300031>

ENGEL, C. L. et al. *Insuficiência Renal Crônica*. Fortaleza: Med Curso: Do Internato à Residência, 2005. v. 5. (Nefrologia).

FARAHAN, H.; NOROUZI, P.; DINARVAND, R.; GANJALI, M.Z. Development of dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry as a simple, rapid and highly sensitive method for the determination of phthalate esters in water samples. A.v.1172, p.105-112, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.001>

Farajzadeh M, Djozan D, Khorram P. Development of a new dispersive liquid-liquid microextraction method in a narrow-bore tube for preconcentration of triazole pesticides from aqueous samples. *Analytica Chimica Acta*. 2012;713:70-8.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.030>

FARAJZADEH, M. A.; SOROURADDIN, S. M.; MOGADDAM, M. R. A. Microextraction methods for the determination of phthalate esters in liquid samples: A review. *Journal of Separation Science*, v. 38, n. 14, p. 2470-2487, 2015.

<https://doi.org/10.1002/jssc.201500013>

FARAJZADEH, M.A, KHOSH MARAM, L., SHEYKHIZADEH, S. A Review on Application of Microextraction Techniques for Analysis of Chemical Compounds and Metal Ions in Foodstuffs. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, v. 1, n. 1, p. 1-19, 2014.

FERNANDES, M.H.C.; GARCIA, E.E.C.; PADULA, M. Migração de Componentes de Embalagens Plásticas para Alimentos. Instituto de Tecnologia de Alimentos, p.153,1987.

FERREIRA, I. D.; MORITA, D. M. Biorremediação de solo contaminado por isobutanol, Bis-2-etilhexilftalato e Di-isodecilftalato. *Revista Brasileira Ciência do Solo*, v.36, p. 643-652, 2012. ISSN 0100- 0683. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832012000200033>. Acesso em 10 de out. de 2019.

<https://doi.org/10.1590/S0100-06832012000200033>

GANGI, J. D. Phthalates in PVC medical products from 12 countries. Greenpeace digital. Disponível em: <http://www.greenpeace.org.uk/MultimediaFiles/Live/FullReport/899.PDF>> Acesso em 8 out. 2019.

GAYATHRI, N. S.; DHANYA, C. R.; INDU, A. R.; KURUP, P. A. Changes in some hormones by low doses of di(2-ethyl exyl)phthalate (DEHP), a commonly used plasticizer in PVC blood storage bags e medical tubing. *The Indian Journal of Medical Research*, v. 119, p. 139-144, 2004.

GRISA, Ana M. C.; CARDOSO, V.; ZOPPAS, B.C.D.A; BRANDALISE, R.N., ZENI, M. Degradação biológica do PVC em aterro sanitário e avaliação microbiológica. *Polímeros*, São Carlos , v. 21, n. 3, 2011.

<https://doi.org/10.1590/S0104-14282011005000046>

HADJMOHAMMADI, M. R.; GHOREISHI, S. S. Determination of estrogens in water samples using dispersive liquid liquid microextraction and high performance liquid chromatography. *Acta Chimica Slovenica*, v. 58, n. 4, p. 765-771, 2011.

HERRERA, A.V.H.; RAMOS, M.A.; BORGES, J.H.; DELGADO, M.A.R. Dispersive liquidliquid microextraction for determination of organic analytes. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 29 p. 728-751, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.03.016>

HEUDORF, U.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; ANGERER, J. Phthalates: Toxicology and exposure. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 210, n. 5, p. 623-634, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.07.011>

HEY, M. J.; JACKSON, D. P.; YAN, H. The salting-out effect and phase separation in aqueous solutions of electrolytes and poly(ethylene glycol). *Polymer*, vol. 46, pg. 2567 - 2572, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.02.019>

HUO, X. et al. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of six fungicides in fruit samples by GC-ECD. *Chromatographia*, v. 73, n. 3-4, p. 313-319, 2011.

<https://doi.org/10.1007/s10337-010-1875-4>

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida : Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. *Scientia Chromatographica*, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

KATO, K.; SILVA, M.; REIDY, J. A.; HURTZ III, D.; MALEK, N. A.; NEEDHAM, L. L.; NAKAZAWA, H.; BARR, D. B.; CALAFAT, A. M. Mono (2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate and mono (2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate as biomarkers for human exposure assessment to di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Environmental Health Perspectives*, v. 112, p. 327-330, 2004.

<https://doi.org/10.1289/ehp.6663>

KAWAGUCHI, M. et al. Miniaturized hollow fiber assisted liquid-phase microextraction with in situ derivatization and gas chromatography-mass spectrometry for analysis of bisphenol A in human urine sample. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 870, n. 1, p. 98-102, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.06.011>

KOCÚROVÁ, L. et al. Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review. *Microchemical Journal*, v. 102, p. 11-17, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.12.002>

KOKOSA, J. M. Advances in solvent-microextraction techniques. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 43, p. 2-13, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.09.020>

KIRK, R. E.; OTHMER, D. F. *Encyclopedia of chemical technology*. 3rd ed. New York: John Wiley, 1995, v. 20, p. 377, 410 e 477.

LANÇAS, F. M., *Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE*, 1ª ed., Campinas: Átomo, 2009.

LATINI, G.; DE FELICE, C.; PRESTA, G.; DEL VECCHIO, A.; PARIS, I.; RUGGIERI, F.; MAZZEO, P. Exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate in humans during pregnancy. A preliminary report. *Biological Neonate*. 93(1):22-4, 2003.
<https://doi.org/10.1159/000067012>

LATINI, G.; DE FELICE, C.; VERROTTI, A. Plasticizers, infant nutrition and reproductive health. *Reproductive Toxicology*. 19:27-33, 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.05.011>

LEME, Ivani Lúcia; SILVA, Virgílio Gustavo. *Recomendações para garantia da qualidade da água tratada para uso em unidades de hemodiálise*. Associação Brasileira de Centros de Diálise e Transplantes, 2003

LUKE, R. G. Insuficiência renal crônica. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. *Tratado de medicina interna*. Trad. Ana Kemper et al. 22. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

MADALENO, E. et al. Estudo do uso de plastificantes de fontes renovável em composições de PVC. *Polimeros*, v. 19, n. 4, p. 263-270, 2009.
<https://doi.org/10.1590/S0104-14282009000400004>

MAGLIOZZI, R.; NARDACCI, R.; SCARSELLA, G.; DI CARLO, V.; STEFANINI, S. effects of the plasticizer DEHP on lung of newborn rats: catalase immunocytochemistry and morphometric analysis. *Histochem Cell Biol*. 120:41-9, 2003.
<https://doi.org/10.1007/s00418-003-0543-2>

MAGNUSSON, O. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics,. [s.l: s.n.].

MARCILLA, A.; GARCÍA, S.; GARCÍA-QUESADA, J.C. Study of the migration of PVC plasticizers. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis. v. 71, p. 457-463,2004.
[https://doi.org/10.1016/S0165-2370\(03\)00131-1](https://doi.org/10.1016/S0165-2370(03)00131-1)

MARTINS, M. L. et al. (artigo 27) Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) fundamentos e aplicações. Scientia Chromatographica, v. 4, n. 1, p. 35-51, 2012.
<https://doi.org/10.4322/sc.2012.004>

MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M.; ZANELLA, R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): Fundamentos e aplicações. Scientia Chromatographica, v. 4, p. 29-45, 2012.
<https://doi.org/10.4322/sc.2012.004>

MELWANKI, M. B. et al. Determination of 7-aminoflunitrazepam in urine by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. Talanta, v. 78, n. 2, p. 618-622, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.12.021>

MENG, L. et al. Application of dispersive liquid-liquid microextraction and CE with UV detection for the chiral separation and determination of the multiple illicit drugs on forensic samples. Forensic Science International, v. 209, n. 1-3, p. 42-47, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.12.003>

MELWANKI, M.; CHEN, W.; BAI, H.; LIN, T.; FUH, M.; Determination of 7- aminoflunitrazepam in urine by dispersive liquid-liquid microextraction with 51 liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. Talanta, vol. 78, pg. 618 - 22, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.12.021>

MOREIRA, B. J.; YOKOYA, J. M. C.; GAITANI, C. M. DLLME fundamentos, aplicações, inovações análise biológica. Scientia Chromatographica, v. 6, n. 3, p. 186-204, 2014.
<https://doi.org/10.4322/sc.2015.005>

MOREIRA, J. B.; YOKOYA, C. M. J.; GAITANI, M. C.; Microextração Líquido-Líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas. Scientia Chromatographica, vol. 6, pg. 186 - 204, 2014.
<https://doi.org/10.4322/sc.2015.005>

MUCELIN, C. A.; BELLINI, M. Lixo e impactos ambientais perceptíveis no ecossistema urbano. *Sociedade e Natureza*, v. 20, n.1, p. 111-124, 2008.

<https://doi.org/10.1590/S1982-45132008000100008>

MUDIAM, M. K. R.; RATNASEKHAR, C. Ultra sound assisted one step rapid derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometric determination of amino acids in complex matrices. [S.l.]: Elsevier B.V., 2013. v. 1291.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.061>

NIAZI, A.; KHORSHIDI, N.; GHAEMMAGHAMI, P. Microwave-assisted of dispersive liquid-liquid microextraction and spectrophotometric determination of uranium after optimization based on BoxBehnken design and chemometrics methods. *Spectrochimica Acta Pat A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 135, p. 69-75, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.06.148>

NUNES, L. R.; RODOLFO JUNIOR, A. *Tecnologia do PVC*, 2006.

OF, D. et al. *Quim. Nova*, v. 35, n. 7, p. 1453-1458, 2012.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000700028>

PAN, J. et al. Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, v. 815, p. 1-15, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.01.017>

PECSOK, R.L.; SHIELDS, L.D. *Modern methods of chemical analysis*. Nova York: John Wiley & Sons, 1968, 480p.

PEGORARO, L.A. Validação de metodologia analítica aplicada ao controle da qualidade de água para HD para fins de credenciamento junto ao Inmetro: projeto hemo tec II. Curitiba: Tecpar; Finep, 2005.

PÉREZ, GARCIA, R; RODRÍGUEZ-BENITEZ, P. La calidad Del líquido de hemodiálisis. In: II Congreso Internacional de Nefrología, 2001. Havana Disponível em <http://www.uninet.edu/cin>>. Acesso dia 11out.2019.

PETROVIC, M. et al. Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. *Journal of Chromatography A*, v. 974,

n. 1-2, p. 23-51, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00907-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00907-X)

PSILLAKIS, E.; MANTZAVINOS, D.; KALOGERAKIS, N. Monitoring the sonochemical degradation of phthalate esters in water using solid-phase microextraction. *Chemosphere*, v.54, p. 849-857, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.09.039>

PŁOTKA-WASYLKA, J. et al. Miniaturized solid-phase extraction techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 73, p. 19-38, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.026>

RAMIREZ, SONIA SILVA. Água pra hemodiálise no estado do Rio de Janeiro: Uma avaliação dos dados gerados pelo programa de monitoramento da qualidade nos anos de 2006-2007. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009. Xv, 38p., Il., tab. Originalmente apresentada como monografia de Pós-graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Developments in hollow fibrebased, liquid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, n. 1, p. 1-10, 2004.

[https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(04\)00105-0](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(04)00105-0)

RETO, A.D.S. Acusações de toxicidade caem no vazio e ftalatos dominam o mercado mundial. *Revista Plástico on-line*. n. 395, setembro, 2007.

REZAEI, M. et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, v. 1116, n. 1-2, p. 1-9, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.007>

REZAEI, M. ET AL. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-UV detection as a very simple, rapid and sensitive method for the determination of bisphenol A in water samples. *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, pg. 1511 - 1514, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.12.091>

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, pp. 2342-2357, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.088>

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n.5, p. 771-780, 2004.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>

SÁNCHEZ-AVILA, J.; VICENTE, J.; ECHAVARRI-ERASUN, B.; PORTE, C.; TAULER, R.; LACORTE, S. Sources, fluxes and risk of organic micropollutants to the Cantabrian Sea (Spain). *Marine Pollution Bulletin*, v. 72, p. 119-132, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.04.010>

SANCO, COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Document nº SANCO/10684/2009. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Uppsala, Suécia. 01/01/2014.

SARAFRAZ-YAZDI, A.; AMIRHASSAN, A. Liquid-phase microextraction. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, Oxford, v. 29, n. 1, pp. 1-14, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.10.003>

SARAJI, M.; BOROUJENI, M. K. Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction, 2014. v. 406.

<https://doi.org/10.1007/s00216-013-7467-z>

SARAJI, M., BOROUJENI, M.K. Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, v. 406, pp. 2027-2066, 2014.

<https://doi.org/10.1007/s00216-013-7467-z>

SHAHBAZIKHAH, Parviz; ASADOLLAHI-BABOLI, Mohammad; KHAKSAR, Ramin; ALAMDARI, Reza F.; ZARE-SHAHABADI, Vali. Predicting partition coefficients of migrants in food simulant/polymer systems using adaptive Neuro-Fuzzy interference system. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, n. 8, p. 1446-1451, 2011.

<https://doi.org/10.1590/S0103-50532011000800007>

SCAPIN, V. O. Avaliação da Contaminação por Elementos Inorgânicos e Ésteres Ftálicos em Poeira Doméstica da Região Metropolitana de São Paulo. Dissertação (Doutorado em Ciências na Área de 86 Tecnologia Nuclear e Materiais) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, 2009.

SERVIÇO BRASILEIRO DE RESPOSTAS TÉCNICAS. BRT - Dossiê Técnico: Qualidade da água de hemodiálise. TECPAR: Curitiba. 2007. P-03. Disponível em: Acesso dia 11 de out. 2019.

SILVA, A. N. M; MARTINS, C. T. B; FERRABOLI, R; JORGETTI, V; ROMÃO Jr, J. E. Revisão/ Atualização em Diálise: Água para hemodiálise. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, São Paulo, v. 18, n.2, 1996. p. 180-188.

SILVA, A. Sanches; FREIRE, J. M. Cruz; GARCÍA, R. Sendón; FRANZ, R. LOSADA, P. Paseiro. Time-temperatura study of the kinetics of migration of DPBD from plastics into chocolate, chocolate spread and margarine. *Food Research International*, v. 40, p. 679-686, 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.11.012>

SILVA, H. G.; SILVA, M. J. Motivações do paciente renal para a escolha a diálise peritoneal ambulatorial contínua. *Revista Eletrônica de Enfermagem*, v. 5 n. 1 p. 10 - 14, 2003. Disponível em <http://www.fen.ufg.br/Revista> Acesso dia 13 de out. de 2019.
<https://doi.org/10.5216/ree.v5i1.774>

SOUZA, R. R.; MARTINS E.A J.; Martins; OTOMO, J.I.; FURUSAWA, H.A.; PIRES, M.A.F.Determinação de plastificantes em água potável utilizando cromatografia gasosa e espectrometria de massas. *Química Nova*, v. 35, p. 1453-1458, 2012.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000700028>

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. e NIEMAN, T. A. (2002). *Princípios de análise instrumental*. 5 ed. Porto Alegre: Bookman (SBQ), p. 598-676.

SPIETELUN, A. et al. Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. *Talanta*, v. 119, p. 34-45, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.10.050>

THOMPSON, M. et al. Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement (Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, v. 71, n. 2, p. 337-348, 1999.
<https://doi.org/10.1351/pac199971020337>

Thomé FS, Karol C, Gonçalves LFS, Manfro RC. Métodos dialíticos. In: Barros E, Manfro RC, Thomé FS, Gonçalves LFS. *Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento*. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1999. p. 272-8

VELA-SORIA, F. et al. UHPLC-MS/MS method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives, bisphenol S, parabens, and benzophenones in human urine samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 406, n. 15, p. 3773-3785, 2014.
<https://doi.org/10.1007/s00216-014-7785-9>

WAHL, H.G.; HONG, Q.; HILDENBRAND, S.; RISLER, T.; LUFT, D.; LIEBICH, H. 4-Heptanone is a metabolite of the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 19:2576-83, 2004.

<https://doi.org/10.1093/ndt/gfh425>

WAHL, H.G.; HONG, Q.; HOFFMANN, A.; HARING, H.; LIEBICH, H.M. Identification of plasticizers in medical products by a combined direct thermodesorption-cooled injection system and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 847:1-7, 1999.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00138-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00138-7)

WANG, Y.; NACSON, S.; PAWLISZYN, J. The coupling of solid-phase microextraction/surface enhanced laser desorption/ionization to ion mobility spectrometry for drug analysis. *Analytica Chimica Acta*. 582(1): 50-54. 16 Jan. 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.08.049>

WANG, Q.; STORN, B.K. Separation and analysis of low molecular weight plasticizers in poly(vinyl chloride) tubes. *Polymer Testing*. 24:290-300, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2004.12.002>

WANG, J.; BO, L.; LI, L.; WANG, D.; CHEN, G.; CHRISTIE, P.; TENG, Y. Occurrence of phthalate esters in river sediments in areas with different land use patterns. *Science of the Total Environment*, p.113-119, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.092>

Wu Q, Zhang M, Xi G, Wang Z. Developments of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 2009;37(2):161-8.

[https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(08\)60082-1](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(08)60082-1)

WEUVE, J.; SÁNCHEZ, B. N.; CALAFAT, A. M.; SCHETTLER, T.; GREEN, R. A.; HU, H.; HAUSER, R. Exposure to phthalates in neonatal intensive care unit infants: urinary concentrations of monoesters and oxidative metabolites. *Environmental Health Perspectives*, v. 114, p. 1424-1431, 2006.

<https://doi.org/10.1289/ehp.8926>

WU, T.; LIU, Y.; YANG, Z.; GAO, H.; ZHOU, Z. Determination of Pyrethroid Pesticides in Environmental Samples using Ionic Liquid Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. *Journal of the Brazilian Chemistry Society*, v. 23, n. 7, pp. 1327-1333, 2012.

<https://doi.org/10.1590/S0103-50532012000700018>

YAN, H. et al. Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for determination of fluoroquinolones in pharmaceutical wastewater. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 54, n. 1, p. 53-57, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.08.007>

ZANG, X; WU. Q.; Z. M. XI, G.; WANG, Z. Developments of Dispersive LiquidLiquid Microextraction Technique. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, vol. 37, 2, pg. 161 - 168, 2009.

[https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(08\)60082-1](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(08)60082-1)

ZAKHARKIV, I. B.; ZUI, M. F.; ZAITSEV, V. N. Dispersive liquid-phase microextraction for determination of phthalates in water. *Journal of Water Chemistry and Technology*, v. 37, n. 2, p. 78-84, 2015.

<https://doi.org/10.3103/S1063455X1502006X>

ZAWADZKI, S.F. Poliésteres Oligoméricos Como Plastificantes Para PVC. Tese de Mestrado, Instituto de Química - UFRJ, Rio de Janeiro, 1989.

ZANG, X. H. et al. Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique. *Fenxi Huaxue/ Chinese Journal of Analytical Chemistry*, v. 37, n. 2, p. 161-168, 2009.

[https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(08\)60082-1](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(08)60082-1)

